UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOTRANSFORMATION VON CARDENOLIDEN DURCH SPEZIELLE ZELLSTÄMME VON DIGITALIS LANATA

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Zhibi Hu

aus Shanghai

1984

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOTRANSFORMATION VON CARDENOLIDEN DURCH SPEZIELLE ZELLSTÄMME VON DIGITALIS LANATA

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Zhibi Hu

aus Shanghai

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	1. Februar 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Reinhard
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Graf

Herrn Prof. Dr. Ernst Reinhard danke ich herzlich für die Themenstellung, für wertvolle Ratschläge und die großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. A.W. Alfermann möchte ich besonders für seine immerwährende Hilfsbereitschaft und zahlreichen anregenden Diskussionen danken.

Herzlichen Dank für gute Zusammenarbeit und wertvolle Unterstützung möchte ich allen Angehörigen des pharmazeutischen Instituts aussprechen.

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet :

NM	Nährmedium
IAA	Indolylessigsäure
PCV	packed cell volume
Upm	Umdrehungen pro Minute
NL	Normalliter
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
FG	Frischgewicht
TG	Trockengewicht
uS	Mikrosiemens
Gluc	Glucose
Glyc	Glycoside
ß-MDt	ß-Methyldigitoxin
ß-MDg	ß-Methyldigoxin
D	Dunkelkultur
L	Lichtkultur
E/A	Maß für das Wachstum der Kultur
Se	Selektion

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung und Problemstellung		1
B	Material und Methoden		6
	1.	Chemikalien	6
	2.	Geräte und Zubehör	7
	3.	Nährmedien	8
	4.	Pflanzenmaterial	10
	5.	Kulturbedingungen	10
	5.1	Suspensionskultur	10
	5.2	Fermenterkulturen	10
	5.3	Kulturen mit Substratzugabe	11
	6.	Probenaufarbeitung	11
	6.1	pH-Messung	11
	6.2	Sedimentationsvolumen (PCV)	12
	6.3	Glucosebestimmung	12
	6.4	Leitfähigkeitsmessung	12
	6.5	Trockengewichtsbestimmung	12

7. Analytik der Glycoside 12

C Ergebnisse 14

1. Screening-Umwandlung von ß-MDt 14
1.1 Liste der Zellstämme 16
1.2 Ergebnisse 24
1.3 Zusammenstellung der Screeningergebnisse 62
1.4 Diskussion der Screeningergebnisse 68
2. Weiterversuch im 1l Kolben 72
2.1 Ergebnisse 73
Zellstamm 10/45 (siehe 3.1)
Zellstamm 10/52 74
Zellstamm 10/56-S-10 75
Zellstamm 10/56-S-20 76
Zellstamm 10/56-S-50 (siehe 3.2)
Zellstamm 10/56-S-70 77
Zellstamm 10/56 Anth. 4 78
Zellstamm 10/56 ST 30 79
Zellstamm 10/56 ST 30-Se (Selektion
aus Stamm 10/56 ST 30) 80
Zellstamm 30673-14-7-5 81
Zellstamm 30690-21-10-4 82
Zellstamm 15-8 83
Zellstamm GPR 2 (siehe 3.3)
2.2 Zusammenstellung der Ergebnisse 84
2.3 Diskussion 86

3.	Versuch zur Ausbeutesteigerung	88
3.1	Zellstamm 10/45	88
3.1.1	Versuche in 1l Kolben	88
3.1.2	Selektionsversuche	100
3.1.3	Fermenterversuche	105
3.2	Zellstamm 10/56-S-50	108
3.2.1	Versuche in 1l Kolben	108
3.2.2	Selektionsversuch	110
3.2.3	Fermenterversuche	111
3.3	Zellstamm GPR 2	114
3.3.1	Versuche in 100 ml Kolben	114
3.3.2	Versuche in 1l Kolben	114
3.3.3	Selektionsversuch	119
3.3.4	Fermenterversuch	120
3.4	Zusammenstellung der Fermentations-ergebnisse	122
3.5	Diskussion	123
D	Zusammenfassung	126
E	Literaturverzeichnis	130

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0002

A Einleitung und Problemstellung

Die Cardenolide aus Digitalis lanata Ehrh. stellen heute die am meisten verwendeten Glycoside dar. Wegen ihrer günstigeren Pharmakokinetik haben Verbindungen vom Typ des Digoxins ("C-Glykosid") eine größere Bedeutung als die vom Typ des Digitoxins ("A-Glykosid") mit fehlender OH-Gruppe an C-12 (siehe Abb. 1). Der steigende Bedarf an Digoxin muß nach wie vor von Pflanzenmaterial von Digitalis lanata gewonnen werden. Verbesserungen in der Gewinnung waren somit bisher vor allem von Fortschritten in der Pflanzenzüchtung abhängig.

Bei der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials zur Gewinnung von Digoxin bzw. seinen Derivaten fällt Digitoxin (bzw. seine Derivate) zu etwa einem Drittel des Gesamtglykosidgemisches an. Es wurde daher versucht, das teure Nebenprodukt Digitoxin oder seine Derivate mit chemischen bzw. mikrobiologischen Mitteln in Digoxinderivate zu überführen. Chemisch ist dieses Problem für eine technische Anwendung

nicht gelöst, erste mikrobiologische Ergebnisse wurden veröffentlicht (SCELECZY und LANG 1980), größere Erfahrungen existieren mit der Biotransformation durch Zellkulturen von Digitalis lanata (Zusammenfassung bei REINHARD und ALFERMANN 1980). Als besonders vielversprechend erwiesen sich hierbei Untersuchungen zur Biotransformation von ß-Methyldigitoxin, das durch spezielle Zellstämme von Digitalis lanata selektiv zu ß-Methyldigoxin hydroxyliert wird.

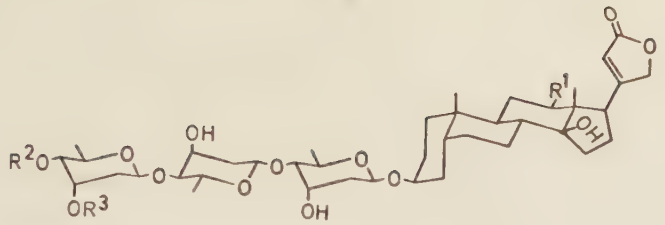
ß-Methyldigitoxin wird ähnlich wie bei der technischen Darstellung von ß-Methyldigoxin aus Digoxin durch chemische Methylierung von Digitoxin gewonnen. Dieses wird dann durch die Zellkulturen zu ß-Methyldigoxin transformiert, das dann als Arzneimittel eingesetzt werden kann (Vergl. dazu Abb.2) Dieses Verfahren konnte bis in eine Pilotfermenteranlage von 200 l Arbeitsvolumen vorangetrieben werden. (ALFERMANN et al. 1983).Neben der Verbesserung der Kulturmethodik und der Fermentertechnologie ist zu einer weiteren Verbesserung der Produktausbeuten die Isolierung von Zellstämmen mit hoher Biotransformationskapazität unbedingt erforderlich. Es ist auch notwendig, immer wieder hochproduzierende Stämme zu isolieren, weil bei Zellkulturen ähnlich wie bei Mikroorganismen das Problem der Stammdegeneration besteht. (ZENK 1978) Die Gründe für eine solche Degeneration sind bisher nicht eindeutig bekannt.

Das einzige bisher verwendete Konzept zur Gewinnung von hochproduzierenden pflanzlichen Zellkulturen besteht darin, von Pflanzen auszugehen, die einen gewünschten Sekundärstoff in hoher Ausbeute bilden. Anschließend werden dann die etablierten Zellkulturen auf die Bildung des gewünschten Sekundärstoffes untersucht. (ZENK et al. 1977) Aus diesem diesem Grund wurden von Heins (1978) Zellkulturen von Digitalis lanata Pflanzen mit hohem Digoxingehalt angelegt und diese Zellkulturen anschließend auf ihre Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Konzentration des C-Glykosides Digoxin in der Pflanze keinen ausreichenden Maßstab für die Hydroxylierungskapazität der Zellkultur darstellt. Daher wurden anschließend von FRIEDRICHSON (1979 und unveröffentlicht) in Anlehnung an den Hydroxylierungstest von WEILER (1974) die Rosettenpflanzen von ca. 2000 Digitalis lanata Pflanzen direkt auf ihre Hydroxylierungskapazität von ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin untersucht. Von ausgewählten hochaktiven und wenigaktiven Pflanzen (Tab. 1) wurden anschließend Zellkulturen angelegt. Diese Zellkulturen sollen in der vorliegenden Arbeit auf ihre Hydroxylierungskapazität untersucht werden.

Es soll somit abgeklärt werden, ob die Höhe der enzymatischen Hydroxylierungskapazität der Pflanze ein hinreichendes Kriterium für die Hydroxylierungskapazität der daraus

angelegten Zellkultur darstellt. Es würde dies die Selektion von hochproduzierenden Digitalis lanata Zellstämmen erleichtern.

Zur Durchführung der Versuche werden die Zellkulturen unter standardisierten Bedingungen in 100 ml Erlenmeyerkolben (25 ml Nährlösung) mit 40 mg/l ß-Methyldigitoxin versetzt. Anschließend wird der Verlauf der Bildung von ß-Methyldigoxin verfolgt. Zur Absicherung der Ergebnisse bei unterschiedlichen Kulturbedingungen werden ausgewählte Stämme noch in 1l Erlenmeyerkolben (300 ml Medium) und im 20 l Airliftreaktor getestet.



	R^1	R^2	R^3
Digoxin	OH	H	H
α-Acetyldigoxin	OH	H	-acetyl
β-Acetyldigoxin	OH	-acetyl	H
β-Methyldigoxin	OH	-methyl	H
Lanatosid C	OH	-Glucose	-acetyl
Desacetyllanatosid	OH	-Glucose	H
Digitoxin	H	H	H
β-Methyldigitoxin	H	-methyl	H
Purpureaglykosid A	H	-Glucose	H

Abb. 1 Strukturformel wichtiger Cardenolide

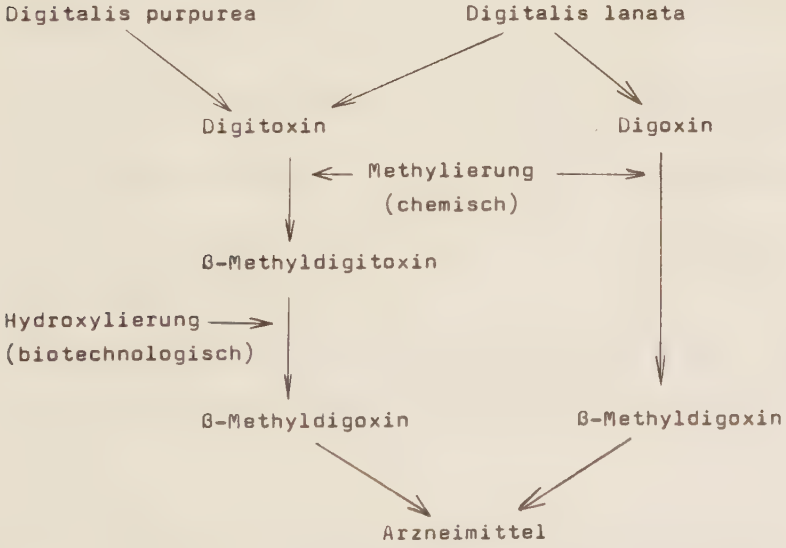


Abb. 2 Biotechnologische Gewinnung von β-Methyldigoxin

B Material und Methoden

1. Chemikalien

Nährmedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) ohne Saccharose, Indolylessigsäure und Kinetin	Flow Laboratories, Irvine/Schottland
Caseinhydrolysat	Difco Laboratories, Detroit Michigan/USA
Glucose	Maizena, Heilbronn
Glucoseoxidase	Beckman , München
β-Methyldigitoxin β-Methyldigoxin	Boehringer, Mannheim

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Form von der Firma Merck,Darmstadt bezogen.

2. Geräte und Zubehör

Schüttelmaschinen	Infors, Basel/Schweiz
Airliftfermenter	Eigenbau (Wahl 1977)
Fermenterzubehör	Ingold, Frankfurt
pH/O_2-Elektroden Typ 465	Braun, Melsungen
pH/O_2-Meß- und Registriergerät	Pall, Sprendlingen
Luftsterilfilter 0,2 um	Lauda, Lauda-Königshofen
Thermostat	Braun, Melsungen
Membranpumpen Fe 211	
Membranpumpenköpfe	Braun, Melsungen
Kleinströmungsmeßgeräte	Krohne, Duisburg
Sterilfilter SM 16510	Sartorius, Göttingen
Membranfilter	Flow, Bonn
	Seitz, Bad Kreuznach
	Schleicher - Schüll, Dassel
Glucoseanalysator	Beckmann, München
pH-Meter	Knick, Berlin
Leitfähigkeitsmeßgerät	Corning, Halstead/England
Gefriertrocknungsanlage Delta IA	Christ, Osterode
Hochdruckflüssigkeitschromatograph 1084 B	
LC - Terminal 79850 B	Hewlett Packard, Frankfurt
HPLC - Säulen	Knauer, Bad Homburg

3. Nährmedien

Als Grundlage wurde ein modifiziertes Murashige und Skoog Medium verwendet. Das Auxin/Kinetin-Verhältnis wurde nach Optimierungsversuchen von HAGEDORN (1977) übernommen.

Grundmedium :	mg/l
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Fe-EDTA	42,8
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \cdot 1\ H_2O$	16,9
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	8,6
KI	0,83
$NaMoO_4 \cdot 1\ H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,025
Thiaminiumdichlorid	0,1
Nicotinsäure	0,5
Pyridoxolhydrochlorid	0,5
Glycin	2,0
myo-Inosit	100,0
Caseinhydrolysat vitaminfrei	1000,0
Indolylessigsäure (Auxin)	1,0
6-Furfurylaminopurin (Kinetin)	2,0
Glucose . 1 H_2O	22,0 g/l

HAGEDORN, W., Tübingen, unveröffentlicht

GD - Medium

Grundmedium

S - Medium

Dieses Medium entspricht dem Grundmedium, jedoch anstatt Glucose mit 6 % (60 g/l) Saccharose .

GPLW - Medium

Dieses Medium entspricht dem Grundmedium: Glucose · 1 H_2O wurde auf 33 g/l , KH_2PO_4 auf 340 mg/l erhöht. Statt bidestilliertem Wasser wurde Leitungswasser verwendet.

oCGPLW - Medium

Hierzu wurde das GPLW - Medium ohne Caseinhydrolysat verwendet.
Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Der pH - Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH 5,5 eingestellt.

Sterilisation

Die Nährmedien im Erlenmeyerkolben und Fermenter sowie die Geräte wie zB. Sterilfilter wurden im Autoklaven (Fedegari Pavia/Italien 1290 E) 20 min bei 121°C sterilisiert. Pipetten, Leergefäße etc. wurden mit Heißluft 3 h bei 180°C erhitzt.

Aufbewahrung der Nährmedien

Alle Medien wurden in einem dunklen Raum abgekühlt und aufbewahrt.

4. Pflanzenmaterial

Als Submerskulturen wurden Zellstämme von Digitalis lanata Ehrh. (Scrophulariaceae) übernommen. Ausgangsmaterial für die Agarkulturen waren die von FRIEDRICHSON(1979) auf 12ß-Hydroxylierung getesteten Pflanzen. Im Ergebnisteil werden diese von Friedrichson für die Pflanze gemessenen Hydroxylierungswerte jeweils aufgeführt. Der Digoxingehalt der Pflanzen wurde bei der Firma Boehringer, Mannheim, ermittelt.

5. Kulturbedingungen

5.1 Suspensionskultur

Zur Stammhaltung wurde das Zellmaterial im Schwachlicht bei 1000 Lux (Osram L 15 W/25 - 2 - Leuchtstoffröhren) oder im Dauerdunkel, in Schüttelmaschinen bei einer Frequenz von 100 Upm und einer Temperatur von 24°C ∓ 1°C, kultiviert. Das Umimpfintervall lag bei einer Woche (1 Passage). Die Schüttelkulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 25 ml Nährmedium überimpft, die Animpfmenge war 2,0 g Frischgewicht.

Die Inoculummenge in 1l Erlenmeyerkolben mit 300 ml Medium betrug 20 g Frischgewicht.

5.2 Fermenterkulturen

Die Fermenterkulturen wurden bei einem Arbeitsvolumen von 20 l, bei Raumbeleuchtung, oder im Dunkeln durchgeführt. Die Inkubationstemperatur lag bei 24°C ∓ 1°C . Die Belüf-

tungsrate schwankte zwischen 100 - 700 NL Luft/h womit eine konstante Sauerstoffkonzentration (30% ige Sättigung) erreicht wurde. Der Volumenverlust, der durch Probenahme und Durchlüftung entstand, wurde mit Wasser wieder auf 20 l ergänzt. Sofern es notwendig war, wurde als Antischaummittel eine Suspension von 1,5 g Polypropylenglykol 2025 in 600 ml Wasser zugesetzt.
Die Fermenter wurden mit jeweils zwölf 1l Erlenmeyerkolben, mit 300 ml Suspensionskultur, inoculiert.

5.3 Kulturen mit Substratzugabe

Für Versuche im Erlenmeyerkolben wurde ß-Mdt in Methanol 80% gelöst, sterilfiltriert (Porengröße 0,2 um), und mit einer sterilen Pipette direkt in den Kolben eingetropft, sodaß eine Konzentration von 40 mg/l ß-Mdt erreicht wurde. Nach 7, 9 und 11 Tagen wurde in 100 ml Kolben die Umsatzrate zu ß-Mdg gemessen. In den 1l Kolben wurde jeden Tag ß-Mdt-Lösung gegeben und alle zwei Tage die Konzentration gemessen.
Bei den Fermentern erfolgte die Substratzugabe, die vorher in ein Vorlagegefäß sterilfiltriert wurde, über eine Pumpe, die durch eine Zeitschaltuhr so gesteuert wurde, daß eine gleichmäßige Versorgung mit ß-MDt über 24 Stunden hinweg, gewährleistet war.

6. Probenaufarbeitung

6.1 pH-Messung

Der pH wurde entweder innerhalb des Fermenters, oder auch extern mit einer Glaselektrode bestimmt.

6.2 Sedimentationsvolumen (PCV)

Die gut gemischte Probe wurde in einen 100 ml Meßzylinder gegeben, und nach 20 min Absetzzeit wurde der Quotient aus Sedimenthöhe zur Gesamthöhe x 100 als Sedimentationsvolumen bestimmt.

6.3 Glucosebestimmung

Der Glucosegehalt des zellfreien Mediums wurde mit einem Glucoseanalysator nach der GOD-Methode gemessen.
Die Nährlösung wurde so verdünnt, daß in einem Bereich von 50 bis 500 mg Glucose/100 ml gemessen werden konnten.

6.4 Leitfähigkeitsmessung

Mit einer Elektrode wurde bei 24°C im Medium direkt die Leitfähigkeit als uS/cm bestimmt.

6.5 Trockengewichtsbestimmung

Durch Filtration wurde die Probe in Kulturfiltrat und Gewebe getrennt. Das Gewebe wurde gefriergetrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt.

7. Analytik der Glykoside (HPLC-Messung)

Programm zur Messung von ß-MDt/ß-MDg aus der Nährlösung

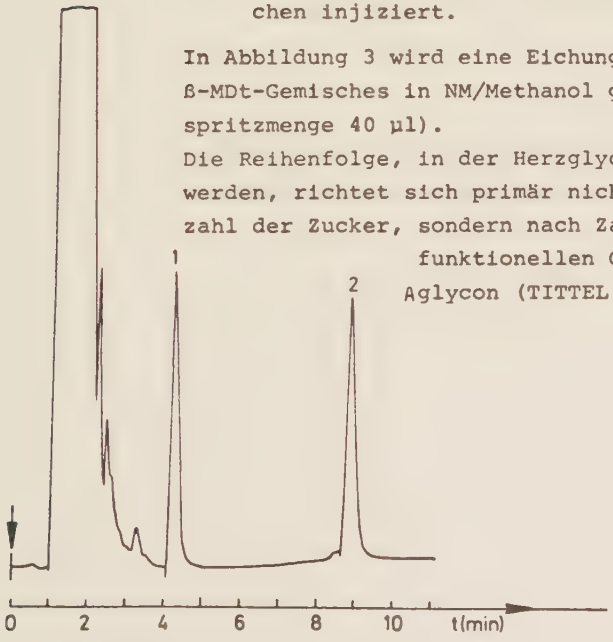
Stationäre Phase: Merck Lichrosorb RP 8, 7 um

Säulen: Hauptsäule : 250 x 4,6

Vorsäule : 40 x 4,6 (Knauer, Bad Homburg)

Mobile Phase: Acetonitril/Wasser 40 : 60
Gradientenprogramm von 40% auf 50% Acetonitril bis min 5, danach isokratisch bis min 11.
Temperatur: Acetonitril 30°C, Wasser 50°C, Ofen 40°C
Flußrate: 2,0 ml/min
Säulendruck: 100 bis 180 bar
Meßwellenlänge: 220 nm, Referenzwellenlänge: 350 nm
Papiergeschwindigkeit: 1 cm/min
Signalabschwächung: 2^6
Einspritzmenge 40 µl
Analysenzeit: 11 min
Probenvorbereitung: 1 ml NM wurde mit 1,5 ml Methanol verdünnt, und zum Schutz der Trennsäule, durch ein Membranfilter 0,2 µm von Schwebstoffen befreit, und in ein Probefläschchen injiziert.

In Abbildung 3 wird eine Eichung eines ß-MDg/ß-MDt-Gemisches in NM/Methanol gezeigt (Einspritzmenge 40 µl).
Die Reihenfolge, in der Herzglycoside eluiert werden, richtet sich primär nicht nach der Anzahl der Zucker, sondern nach Zahl und Art der funktionellen Gruppen am Aglycon (TITTEL und WAGNER 1980)



1. ß-Methyldigoxin
2. ß-Methyldigitoxin

Abbildung 3: HPLC-Trennung von ß-MDg/ß-MDt

C Ergebnisse

1. Screening Umwandlung von β-MDt

Ausgangspunkt für folgende Untersuchungen sind 85 Zellstämme, die von Friedrichson übernommen wurden.
Um hochproduzierende pflanzliche Zellkulturen für technische Prozesse nutzen zu können wäre es wünschenswert,einen Zusammenhang zwischen der Biotransformationskapazität der Pflanze sowie daraus angelegter Zellkulturen zu finden.
Dabei wurden von Pflanzen,die den gewünschten Sekundärstoff in hoher Ausbeute bilden,Zellkulturen von Blattrosetten, Stengelabschnitten in verschiedenen Abständen zum Sproß, Antheren verschieden großer Blütenknospen sowie Seitentrieben untersucht.
Tabelle 1 " Liste der Zellstämme " gibt nun unter anderem den Digoxingehalt und die Hydroxylierungskapazität der Ausgangspflanze wieder, aus welcher die Zellkulturen angelegt wurden.

Durch das folgend beschriebene Verfahren soll nun die Biotransformationsaktivität der Zellkulturen getestet werden, um eventuelle Zusammenhänge mit der Hydroxylierungskapazität der Ausgangspflanze korrelieren zu können. Außerdem sollen durch diesen Versuch leistungsfähigere Stämme von solchen, welche geringere Hydroxylierungskapazität aufweisen, zur weiteren Untersuchung eliminiert werden.

Durchführung der Versuche :

Die in Tabelle 1 aufgeführten Zellstämme wurden als Stammkulturen auf Agarmedium gehalten und für die Versuche in flüssiges Medium überführt. Jeweils 2g Frischgewicht der Suspensionskulturen wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium überimpft. Die Passagendauer betrug jeweils 1 Woche. Die bei den Versuchen angegebene Passagenzahl ist gerechnet seit Überführung der Kulturen von Agar- in Flüssigmedium. Vor der Substratzugabe wurden die Zellaggregate 4 Tage in den Kolben auf der Schüttelmaschine bei einer Frequenz von 100 Upm und einer Temperatur von 24 $\mp$ 1^{o}C gehalten. pH, Glucosekonzentration, Trockengewicht, ß-MDt und ß-MDg wurden nach 7, 9 und 11 Tagen ab Versuchsbeginn gemessen. In Tabelle 2 " Zusammenstellung der Screening Ergebnisse " sind nun die absoluten Mengen an ß-MDt und ß-MDg sowie die prozentualen Größen bezogen auf 40 mg/l MDt (= 100%), welche 7, 9, bzw. 11 Tage nach Zugabe von 40 mg/l MDt gemessen wurden, dargestellt.

1.1 Screening

Tab. 1 Liste der Zellstämme

Zellstamm	Ausgangspflanze Dg-gehalt %	Hydrox. %	Anlage der Agarkul-turen aus	Anlage d. Agarkul-turen am	Passage Submers-kulturen	Nähr-Medium	Zellaggr. Durchm. mm	Farbe
9/50 L.	0,450	41	Blattroset.	5. 79	55.	S	1-3	hellbraun
9/50 D.	0,450	41	Blattroset.	5. 79	30.	S	1-3	hellbraun
9/75 L.	0,255	43	Blattroset.	5. 79	48.	S	2-5	gelbgrün
9N/215 L.	0,410	41	Blattroset.	5. 79	47.	S	2-4	gelbgrün
9N/218 L.	0,320	43	Blattroset.	5. 79	55.	S	1-3	hellbraun
9N/229 L.	0,415	11	Blattroset.	5. 79	46.	S	1-3	gelbgrün
20/231 L.	0,095	3	Blattroset.	5. 79	47	S	1-3	hellgrün
21/425 L.	0,335	44	Blattroset.	5. 79	30	S	1-3	gelblich
10/45 L.	0,455	18	Blattroset.	5. 79	48.	S	1-3	gelbgrün
10/50 L.	0,320	47	Blattroset.	5. 79	48.	S	2-3	hellbraun
10/52 L.	0,405	47	Blattroset.	5. 79	48.	S	1-3	hellbeige

10/52 D.	0,405	47	Blattroset.	5. 79	35.	S	1-3	hellbraun
10/56 L.	0,455	47	Blattroset.	5. 79	52.	S	1-3	gelblich
10/56 D.	0,455	47	Blattroset.	5. 79	33.	S	1-3	hellgrün
10/56-S-10 L.	0,455	47	Stengel 10 cm ab Sp.	5. 79	48	S	1-3	gelblich
10/56-S-10 D.	0,455	47	Stengel 10 cm ab Sp.	5. 79	34.	S	2-4	gelblich
10/56-S-20 D.	0,455	47	Stengel 20 cm ab Sp.	5. 79	39.	S	2-4	gelblich
10/56-S-50 L.	0,455	47	Stengel 50 cm ab Sp.	5. 79	47.	S	1-3	gelbgrün
10/56-S-50 D.	0,455	47	Stengel 50 cm ab Sp.	5. 79	34	S	1-3	gelb
10/56-S-70 D.	0,455	47	Stengel 70 cm ab Sp.	5. 79	35.	S	2-4	gelbgrün
10/56 Anth.4 D.	0.455	47	Anth.V.4mm gr.Blütenk.	5. 79	33.	S	2-4	gelb
10/56 Anth.5 L.	0,455	47	Anth.V.5mm gr.Blütenk.	5. 79	48.	S	1-3	grünlich

Zellstamm	Ausgangspflanze Dg-gehalt %	Hydrox. %	Anlage der Agarkulturen aus	Anlage d. Agarkulturen am	Passage Submerskulturen	Nähr-Medium	Zellaggr. Durchm. mm	Farbe
10/56 Anth.5 D.	0,455	47	Anth.v.5mm gr.Blütenk.	5. 79	34.	S	2-4	hellgrün
10/56 Anth.6 L.	0,455	47	Anth.v.6mm gr.Blütenk.	5. 79	48.	S	1-3	graugrün
10/56 Anth.6 D.	0,455	47	Anth.v.6mm gr.Blütenk.	5. 79	34.	S	1-3	hellbraun
10/56 ST20 L.	0,455	47	Seitentrieb	7. 79	55.	S	2-4	gelbgrün
10/56 ST30 D.	0,455	47	Seitentrieb	7. 79	33.	S	1-3	gelblich
10/56 ST40 L.	0,455	47	Seitentrieb	7. 79	9.	S	2-4	hellbraun
413 Bl D.	0,150	6	Blattroset.	6. 81	3.	S	2-4	gelbgrün
413 S D.	0,150	6	Stengel	6. 81	3.	S	1-3	hellgelb
419 Bl D.	0,290	23	Blattroset.	6. 81	3.	S	1-3	gelbgrün
419 S D.	0,290	23	Stengel	6. 81	3.	S	2-4	gelbgrün
597 S D.			Stengel	6. 81	3.	S	1-3	gelbgrün

601 A5 D.			Anth.v.5mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	1-4	gelbgrün
602 B1 D.			Blattroset.	6. 81	3.	S	1-3	gelb
602 S D.			Stengel	6. 81	3.	S	1-3	gelblich
1318 A4 D.			Anth.v.4mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	1-3	gelbgrün
1318 S D.			Stengel	6. 81	3.	S	1-3	gelb
2311 A7 D.	0,590	18	Anth.v.7mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	1-3	hellgelb
2311 S D.	0,590	18	Stengel	6. 81	3.	S	1-3	hellgelb
2384 A4 D.	0,670	14	Anth.v.4mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	1-3	hellbraun
2384 S D.	0,670	14	Stengel	6. 81	3.	S	1-3	hellgelb
2473 A4 D.	0,590	28	Anth.v.4mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	2-3	gelbgrün
2473 Na D.	0,590	28	Narbe	6. 81	3.	S	2-4	gelblich
2478 A8 D.	0,550	31	Anth.v.8mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	2-3	hellbeige

Zellstamm	Ausgangspflanze Dg-gehalt %	Hydrox. %	Anlage der Agarkulturen aus	Anlage d. Agarkulturen am	Passage Submerskulturen	Nähr-Medium	Zellaggr. Durchm. mm	Farbe
2478 Na D.	0,550	31	Narbe	6. 81	3.	S	2-4	gelblich
2478 S D.	0,550	31	Stengel	6. 81	3.	S	1-3	gelbgrün
2500 A5 D.	0,640	9	Anth.v.5mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	1-3	gelblich
2500 S D.	0,640	9	Stengel	6. 81	3.	S	1-3	gelbgrün
2502 S D.			Stengel	6. 81	3.	S	1-3	gelb
3336 A6 D.	0,470	16	Anth.v.6mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	1-3	gelblich
3336 Na D.	0,470	16	Narbe	6. 81	3.	S	1-3	gelblich
3336 S D.	0,470	16	Stengel	6. 81	3.	S	1-3	hellgelb
3488 A8 D.	0,400	24	Anth.v.8mm gr.Blütenk.	6. 81	3.	S	2-3	gelbgrün
3488 S D.	0,400	24	Stengel	6. 81	3.	GD	1-3	gelb
3490 S D.			Stengel	6. 81	.	GD	2-3	gelbgrün

4019 Bl D.	0,500	14	Blattroset.	6. 81	3.	GD	2-3	blaßgelb
4019 S D.	0,500	14	Stengel	6. 81	3.	GD	1-3	hellgelb
4021 Bl D.			Blattroset.	6. 81	3.	GD	2-3	gelbgrün
4021 S D.			Stengel	6. 81	3.	GD	2-3	gelbgrün
4025 Bl D.			Blattroset.	6. 81	3.	GD	1-3	gelblich
4069 Bl D.			Blattroset.	6. 81	3.	GD	1-3	farblos
4250 Bl D.	0,460	21	Blattroset.	6. 81	3.	GD	2-3	gelbgrün
4250 S D.	0,460	21	Stengel	6. 81	3.	GD	2-4	hellgelb
30614-9-14-4 D.			Anth.v.4mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	gelbgrün
30614-9-14-6 D.			Anth.v.6mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	gelb
30614-9-14-7 D.			Anth.v.7mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	2-4	hellbeige
30625-10-2-4 D.			Anth.v.4mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	hellbraun
30625-10-10-3 D			Anth.v.3mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	hellgelb

Zellstamm	Ausgangspflanze Dg-gehalt %	Hydrox. %	Anlage der Agarkulturen aus	Anlage d. Agarkulturen am	Passage Submerskulturen	Nähr-Medium	Zellaggr. Durchm. mm	Farbe
30673-14-6-2 D.			Anth.v.2mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	gelb
30673-14-7-2 D.			Anth.v.2mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	hellgelb
30673-14-7-5 D.			Anth.v.5mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	hellbeige
30673-22-6-3 D.			Anth.v.3mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	hellgelb
30689-20-8-4 D.			Anth.v.4mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	2-3	hellbraun
30690-21-10-4D.			Anth.v.4mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	gelblich
15-8 D.	0,260	42	Blattstiele	4. 79	3.	GD	2-4	hellgelb
55-7 D.	0,150	42	Blattstiele	4. 79	3.	GD	1-3	hellbraun

130-6 D.			Anth.v.6mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	gelbgrün
130-8 D.			Anth.v.8mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	gelbgrün
228-7 D.	0,165	4	Anth.v.7mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	blaßgelb
285 D.			Blattroset.	4. 79	3.	GD	1-3	hellbraun
508 D.			Blattroset.	4. 79	3.	GD	2-3	hellbraun
516-5 D.			Anth.v.5mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	gelb
Tref. 6			Stengel	4. 79	3.	GD	2-4	hellgelb
Tü-La-1-7			Anth.v.7mm gr.Blütenk.	4. 79	3.	GD	1-3	hellgrün

1.2 Ergebnisse

Den Versuchsverlauf aller in Tab.1 dargestellten Zellstämme durch ein Schaubild sowie eine Beschreibung genau zu erläutern würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.
Deshalb wurden im folgenden nur 18 Zellstämme ausgewählt, bei welchen ab Zugabe von 40 mg/l β-MDt nach 8 Versuchstagen mehr als 50 % β-MDg im Nährmedium gefunden wurden :

Zellstamm 9/50 als Dunkel und Lichtkultur
Zellstamm 10/52 als Dunkel und Lichtkultur
Zellstamm 10/56 -S- 10 als Dunkel und Lichtkultur
Zellstamm 10/56 -S- 50 als Dunkel und Lichtkultur
Zellstamm 10/56 Anth. 4 als Dunkelkultur
Zellstamm 10/56 ST 30 als Dunkelkultur
Zellstamm 2500 A5 als Dunkelkultur
Zellstamm 30625 -10- 10- 3 als Dunkelkultur
Zellstamm 30690 -21- 10- 4 als Dunkelkultur
Zellstamm 10/45 als Lichtkultur
Zellstamm 10/56 als Dunkel und Lichtkultur
Zellstamm 10/56 -S- 20 als Dunkelkultur
Zellstamm 10/56 -S- 70 als Lichtkultur
Zellstamm 10/56 Anth. 5 als Dunkel und Lichtkultur
Zellstamm 2478 A8 als Dunkelkultur
Zellstamm 30673 -14- 7- 5 als Dunkelkultur
Zellstamm 15 -8 als Dunkelkultur

Zellstamm 9/50

Der Digoxingehalt der Ausgangspflanze betrug 0,450%, die Hydroxylierungsrate war 41%. Dieser Stamm wurde in Lichtkultur und Dunkelkutur untersucht.

Getestet wurde der Lichtstamm in der 55. Passage, angeimpft mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,194 g TG). Die Zellaggregate waren 1-3 mm groß und hellbraun gefärbt. Die Zellmasse hatte sich nach 11 Tagen verdoppelt, die Restglucose war 10,4 g/l.

Der Dunkelstamm wurde in der 30. Passage, angeimpft mit 2g (FG) Gewebe (= 0,185 g TG). Die hellbraunen Zellaggregate hatten einen Durchmesser von 1 - 3 mm. Nach 11 Tagen war die Zellmasse 2,4 mal mehr als angeimpft. Die Restglucose betrug 19 g/l.

Nach 3, 5, 7 weiteren Versuchstagen (nach Zugabe der ß-MDt Lösung) hatte der Lichtstamm 13,7%, 19,4% und 55,0% ß-MDt zu ß-MDg hydroxyliert. Beim Dunkelstamm wurde nach 3 und 5 Tagen noch kein ß-Mdg gefunden, nach weiteren 2 Tagen betrug die Hydroxylierungsrate jedoch 31,2%.

Lichtkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	4,70	12,4	12,7	2,0	22,7	50,9	5,5	13,7
5	4,82	9,3	14,6	2,3	19,2	50,0	7,6	19,4
7	4,80	9,0	15,3	2,4	16,0	40,0	22,0	55,0

Dunkelkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/L	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	4,70	24,0	15,1	2,1	29,2	73,0	0	0
5	4,73	21,5	15,2	2,1	28,6	71,6	0	0
7	4,71	19,0	17,5	2,4	20,8	52,0	12,5	31,2

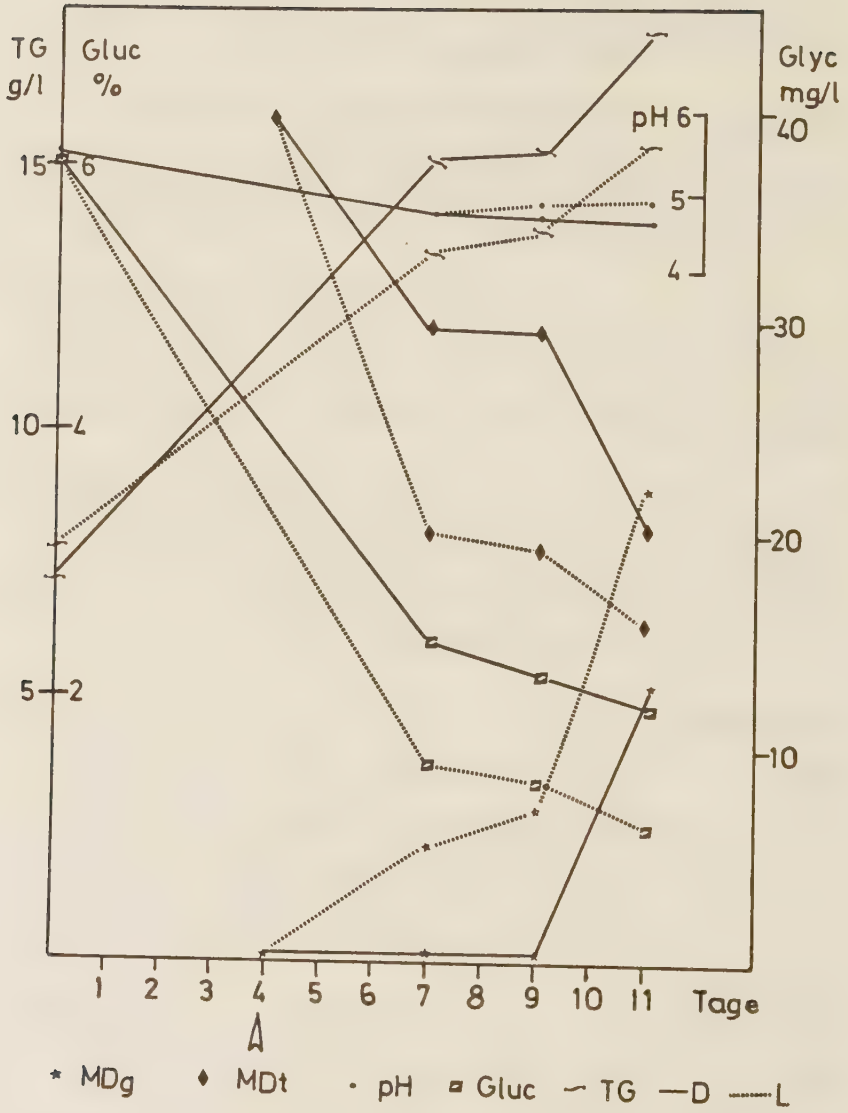


Abb. 4 Zellstamm 9/50 D und L

Zellstamm 10/45

Die Ausgangspflanze hatte einen Digoxingehalt von 0,455%, die Hydroxylierungsrate betrug 18%.

Getestet wurde der Lichtstamm in der 48. Passage, die Animpfmenge betrug 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,158 g TG). Die Kultur hatte 1-2 mm große, gelblich-hellgrüne Zellaggregate. Die Zellmasse war innerhalb der 11 Versuchstage auf das 2,8 Fache angewachsen, im Nährmedium wurde noch 3,5 g/l Restglucose gemessen.

Die Biotransformationsaktivität dieses Stammes war sehr hoch. 3,5 Tage nach Zugabe der ß- Mdt- Lösung wurden 76,0%, 94,5% und 93,2% ß-MDg gemessen. Nach 5 Tagen wurde kein ß-Mdt in der Nährlösung gefunden.

Lichtkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,00	19,6	11,2	1,8	5,4	13,6	30,5	76,0
5	4,50	11,7	12,3	2,0	0	0	37,8	94,5
7	4,75	3,5	17,9	2,8	0	0	37,3	93,2

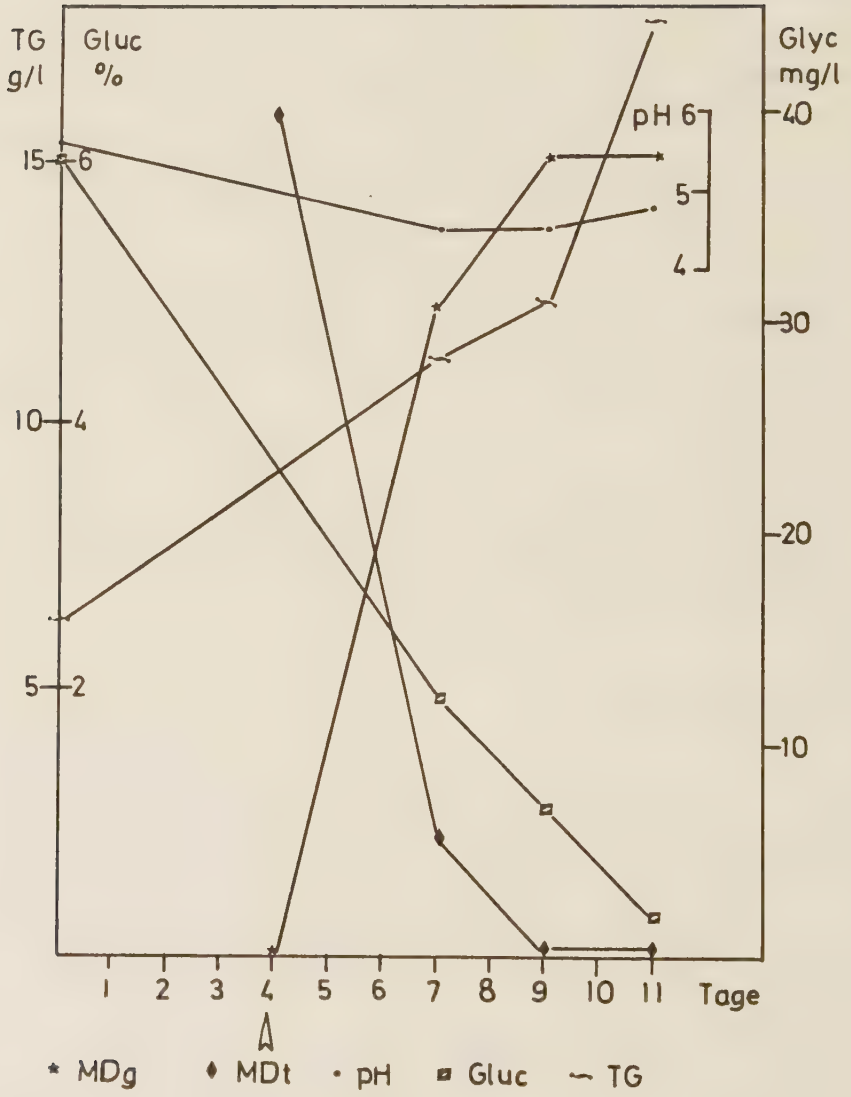


Abb. 5 Zellstamm 10/45 D

Zellstamm 10/52

Der Digoxingehalt der Ausgangspflanze betrug 0,405%, die Hydroxylierungsrate 47%. Dieser Stamm wurde in Licht- und Dunkelkultur untersucht.

Die Lichtkultur befand sich in der 48. Passage, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,180 g TG). Die hellbeigen Zellagregate hatten eine Größe von 1-3 mm. Nach 11 Tagen betrug die Zellmasse das 2,2 Fache der Animpfmenge, 17,8 g/l Restglucose waren vorhanden.

Die Dunkelkultur war in der 35. Passage, angeimpft mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,176 g TG). Die 1-3 mm großen Zellaggregate waren hellbraun. Nach 11 Tagen hatte sich die Zellmasse nur verdoppelt. Es waren noch 20,5 g/l Glucose vorhanden.

Die Biotransformationsrate von ß-Mdt zu ß-MDg waren nach 3, 5, 7 Versuchstagen bei der Lichtkultur 20,3%, 42,0% bzw. 56,4% und bei der Dunkelkultur 28,0%, 52,0%, 89,0%. Es zeigte sich deutlich, daß bei diesem Stamm die Biotransformationsaktivität der Lichtkultur höher war als die der Dunkelkultur. Es wurde nach 7 Versuchstagen kein ß-MDt mehr in der Nährlösung der Lichtkultur gefunden.

Lichtkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	4,75	24,0	11,9	1,7	26,4	66,0	8,1	20,3
5	4,77	18,0	14,8	2,1	14,0	35,0	16,8	42,0
7	4,79	16,5	16,3	2,3	7,6	19,0	22,5	56,4

Dunkelkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,50	23,2	11,8	1,7	18,6	47,0	11,1	28,0
5	5,00	20,4	14,9	2,1	15,1	38,0	20,7	52,3
7	5,00	20,0	15,4	2,2	0	0	35,6	89,0

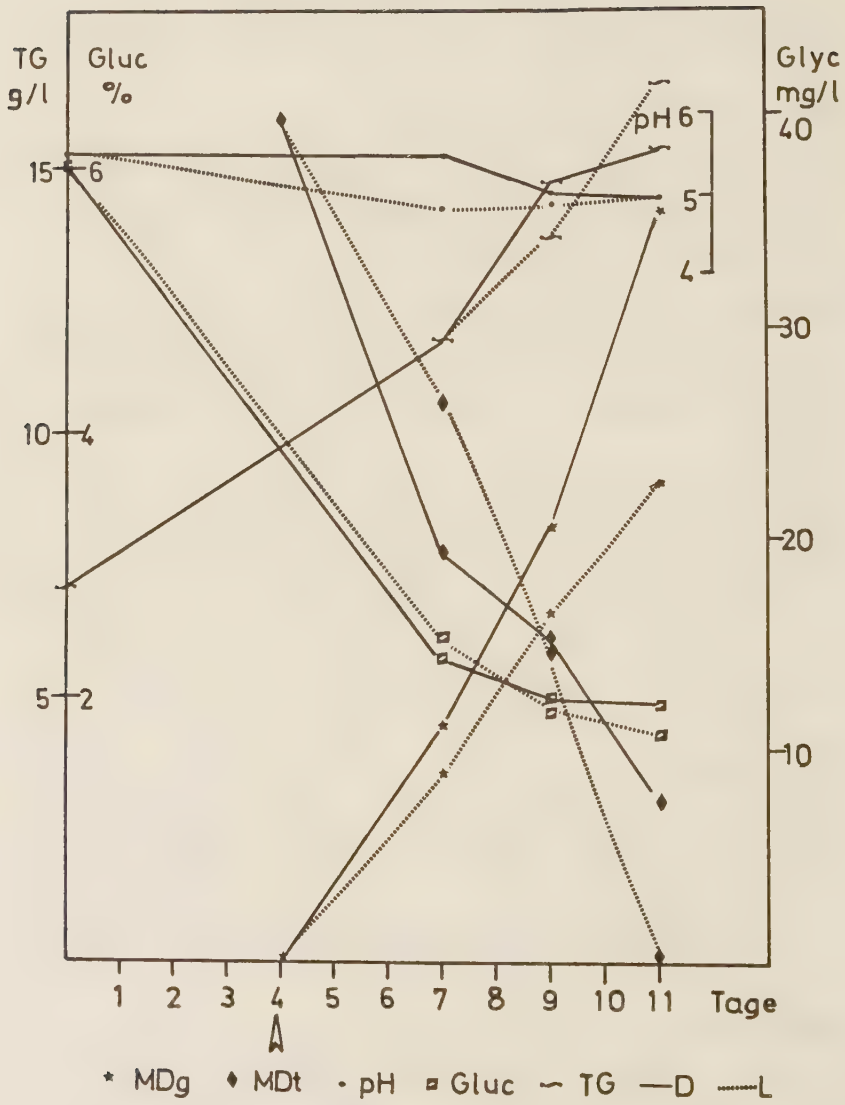


Abb. 6 Zellstamm 10/52 D und L

Kulturen der Pflanze 10/56

Die Pflanze 10/56 hatte einen Digoxingehalt von 0,455% und eine Hydroxylierungsrate von 47%.

Das Ausgangsgewebe für diese Kulturen stammte von verschiedenen Pflanzenorganen.

Der Stamm 10/56 wurde aus der Blattrosette angelegt.

Aus dem Blütenstengel wurden die Stämme 10/56 -S- 10, 10/56 -S- 20, 10/56 -S- 50 und 10/56 -S- 70 angelegt. Die Kulturen wurden aus verschiedenen Bereichen des Stengels angelegt : 10, 20, 50 und 70 bedeuten die Abstände in cm von der Stengelspitze ab gemessen.

Aus Blütenknospen von 4, 5 und 6 mm Durchmesser wurden die Antheren für die Stämme Anth. 4, Anth. 5 und Anth.6 entnommen.

Nachdem der Blütenstengel abgeschnitten war, bildete die Pflanze Seitentriebe. Die Stämme ST 20, ST 30 und ST 40 wurden aus dem Seitentrieb angelegt.

Zellstamm 10/56

Ausgangsmaterial für diesen Stamm war ein Blatt der Blattrosette. Dieser Stamm wurde in Lichtkultur und Dunkelkultur untersucht.

Das Biotransformationsverhalten der Lichtkultur wurde in der 52. Passage getestet. Die Animpfmenge betrug 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,325 g TG). Das gelbliche Gewebe bestand aus 1-3 mm grossen Zellaggregaten.Die Zellmasse war nach 11 Tagen auf das 1,2 Fache der Animpfmenge angewachsen, die Restglucose betrug 26,4 g/l.

Die Dunkelkultur wurde in der 33. Passage angeimpft mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,306 g TG). Das Gewebe war gelbgrün gefärbt mit 1-3 mm großen Zellaggregaten.Die Gewebemasse wuchs nur sehr langsam, die Restglucose betrug 22,5 g/l .

In der Lichtkultur konnte keine Hydroxylierung festgestellt werden, in der Dunkelkultur wurden nach 3, 5, 7 Versuchstagen 20%, 20,5% und 53,0% ß-MDg gemessen.

Lichtkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,75	30,7	14,4	1,1	39,0	90,0	0	0
5	5,85	29,4	14,6	1,1	31,2	78,0	0	0
7	5,85	26,4	15,4	1,2	19,7	50,0	0	0

Dunkelkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,65	24,2	12,4	1,0	27,5	68,8	7,9	20,0
5	5,25	22,6	13,7	1,1	26,8	67,0	8,2	20,5
7	5,30	22,5	16,1	1,3	13,3	33,0	21,1	53,0

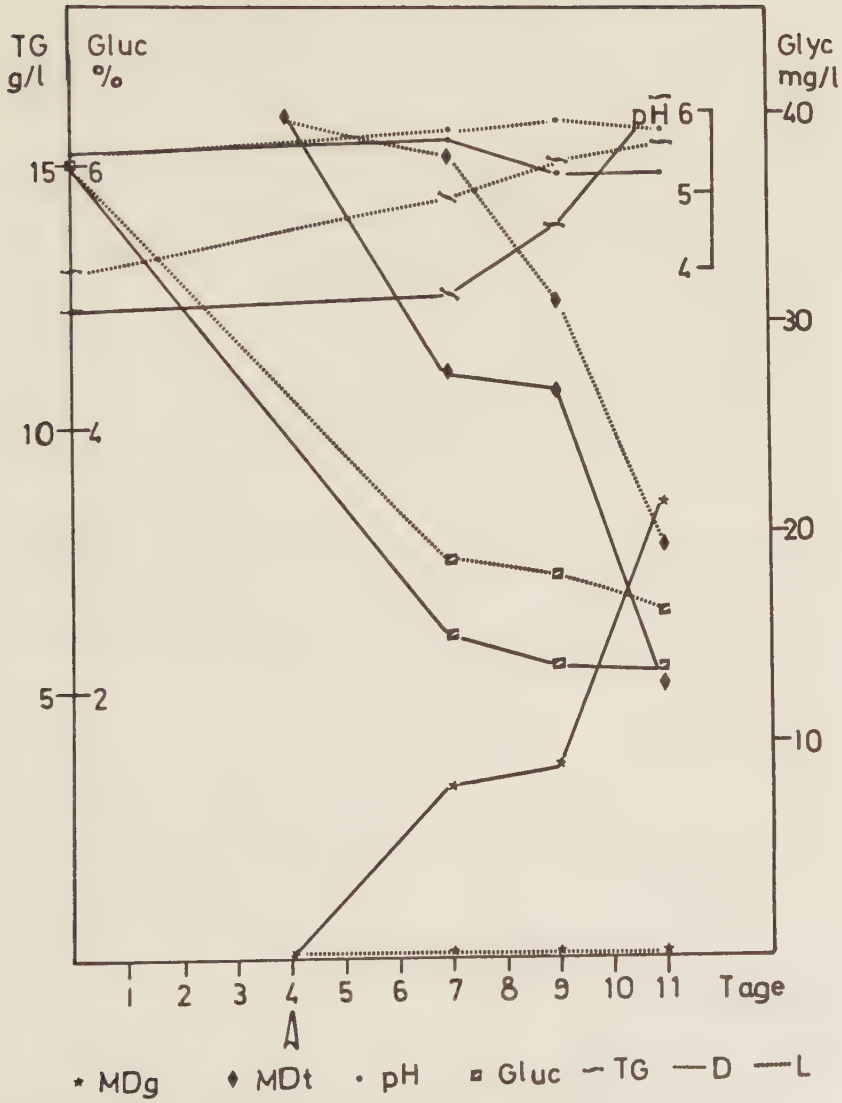


Abb. 7 Zellstamm 10/56 D und L

Zellstamm 10/56 -S- 10

Für die Anlage dieses Stammes wurde der Blütenstengel verwendet, und zwar stammt das Gewebe aus dem Bereich von 10 cm unterhalb der Spitze des Blütenstengels. Dieser Stamm wurde in der Lichtkultur sowie in Dunkelkultur untersucht.

Der Lichtstamm wurde in der 48. Passage getestet, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,155 g TG). Die 2-4mm großen Zellagregate waren gelblich-hellgrün. Das Zellgewebe war auf das 2,4 Fache der Animpfmenge angewachsen, es waren noch 25,1 g/l Restglucose vorhanden.

Die Dunkelkultur wurde in der 34. Passage getestet, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,255 g TG). Die 1-3 mm großen Zellagregate waren gelblich. Die Zellmasse betrug das 1,6 Fache, die Restglucose 23,4 g/l nach 11 Versuchstagen.

Die Biotransformationsrate von ß-MDt zu ß-MDg war nach 3, 5, 7 Versuchstagen 25,7%, 42,2% und 45,4% bei der Lichtkultur und 49,0%, 80,0% und 95,7% bei der Dunkelkultur. Die Biotransformationsaktivität der Dunkelkultur war damit höher als die der Lichtkultur.

Lichtkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	4,79	27,3	14,4	2,6	22,1	55,1	10,3	25,7
5	4,75	25,1	14,4	2,6	15,2	38,0	17,3	42,2
7	4,85	24,4	14,9	2,7	13,8	34,0	18,2	45,4

Dunkelkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,35	26,5	13,9	1,4	13,2	32,8	19,5	49,0
5	5,00	23,2	15,6	1,5	0	0	31,9	80,8
7	5,00	23,0	16,0	1,6	0	0	38,3	95,7

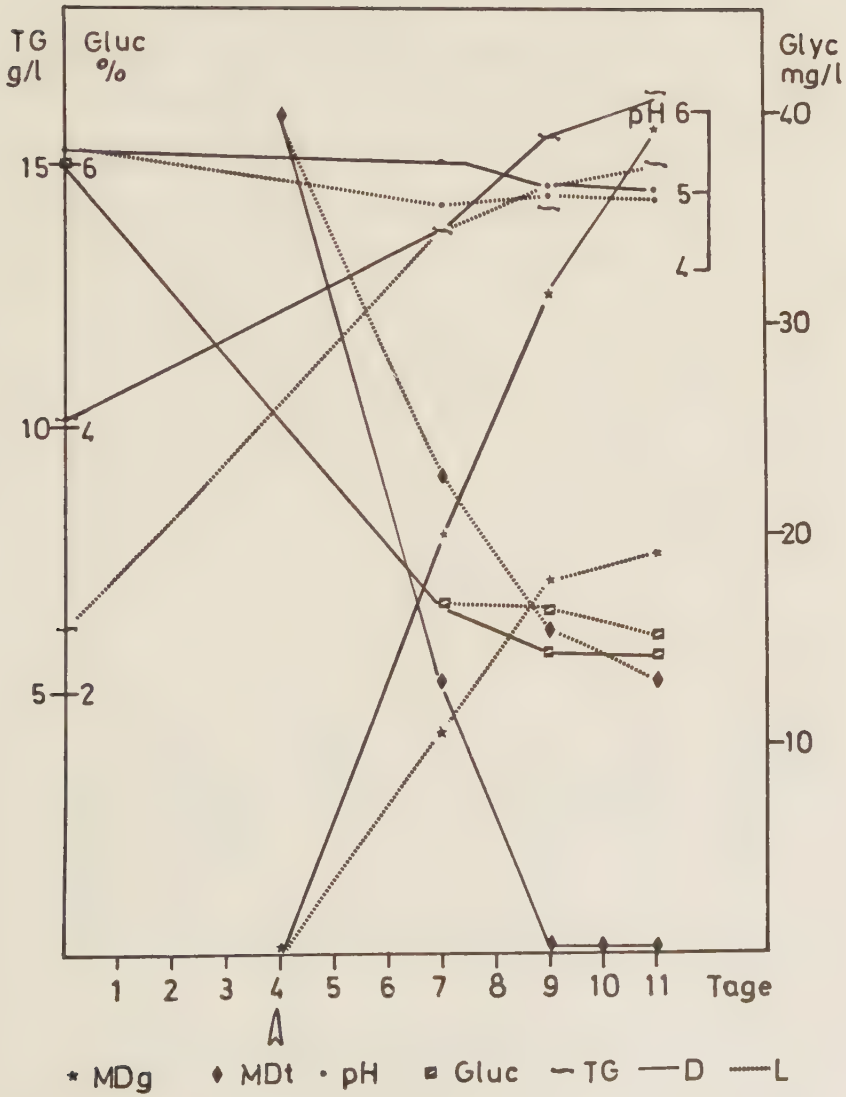


Abb. 8 Zellstamm 10/56-S-10 D und L

Zellstamm 10/56 -S- 20

Für die Anlage dieses Stammes wurde der Blütenstengel verwendet, und zwar stammt das Gewebe aus dem Bereich von 20 cm unterhalb der Spitze des Blütenstengels.

Die Dunkelkultur wurde in der 39. Passage getestet, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,150 g TG). Die 2-4 mm großen Zellaggregate waren gelblich. Das Zellgewebe war auf das 2,2 Fache der Animpfmenge angewachsen, es waren noch 25,3 g/l Restglucose vorhanden.

Der Stamm hydroxylierte nach 3, 5, 7 Versuchstagen 65,1% 86,2% und 92,4 % ß-MDt zu ß-MDg. Nach 8 Tagen wurde kein ß-MDt mehr gefunden.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,35	28,6	12,1	2,0	10,3	25,8	26,0	65,1
5	5,20	26,5	12,6	2,1	2,1	5,2	34,5	86,3
7	5,05	25,3	13,8	2,2	0	0	37,0	92,4

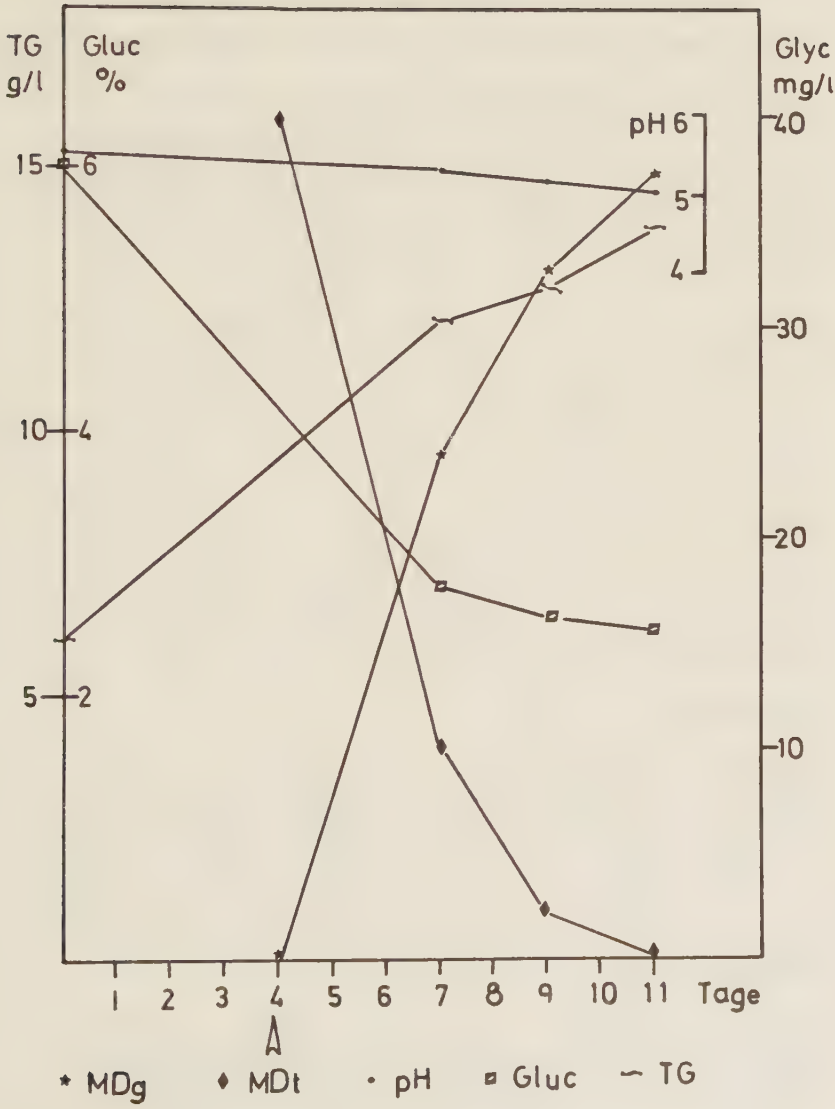


Abb. 9 Zellstamm 10/56-S-20 D

Zellstamm 10/56 -S- 50

Ausgangsmaterial für diesen Stamm waren Teile des Blütenstengels in 50 cm Entfernung von der Stengelspitze. Dieser Stamm wurde als Licht- und Dunkelkultur untersucht.

In der 47. Passage wurde die Lichtkultur getestet : Die Animpfmenge betrug 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,208 g TG). Die Kultur setzte sich aus gelblich-grünen, 1-3 mm großen Aggregaten zusammen. Die Zellmässe war auf das 1,9 Fache angewachsen, im Nährmedium waren noch 19,5 g/l Restglucose vorhanden.

Die Dunkelkultur befand sich in der 31. Passage, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,250 g TG). Die 1-3 mm großen Zellaggregate waren gelblich . Die Zellmasse war nach 11 Tagen auf das 1,6 Fache angewachsen, es waren noch 24,1 g/l Glucose vorhanden.

In der Lichtkultur wurden in 3, 5, 7 Tagen 43,0%, 54,0% und 97,5% des eingesetzten Substrats zu ß-MDg hydroxyliert. Nach 7 Tagen wurde kein ß-MDt wiedergefunden. In der Dunkelkultur wurden nach 3, 5, 7 Tagen 36,0%, 51,0% und 60,0% des eingesetzten Substrats zu ß-MDg hydroxyliert.

Lichtkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,20	26,1	13,3	1,6	17,3	43,0	17,2	43,0
5	5,10	20,9	14,2	1,7	8,6	22,0	21,5	54,0
7	4,90	19,5	15,5	1,9	0	0	39,0	97,5

Dunkelkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,30	27,5	14,2	1,4	9,9	24,2	14,2	36,0
5	4,95	25,6	15,5	1,5	8,6	21,4	20,3	51,0
7	4,90	24,1	17,0	1,7	5,6	14,0	23,8	60,0

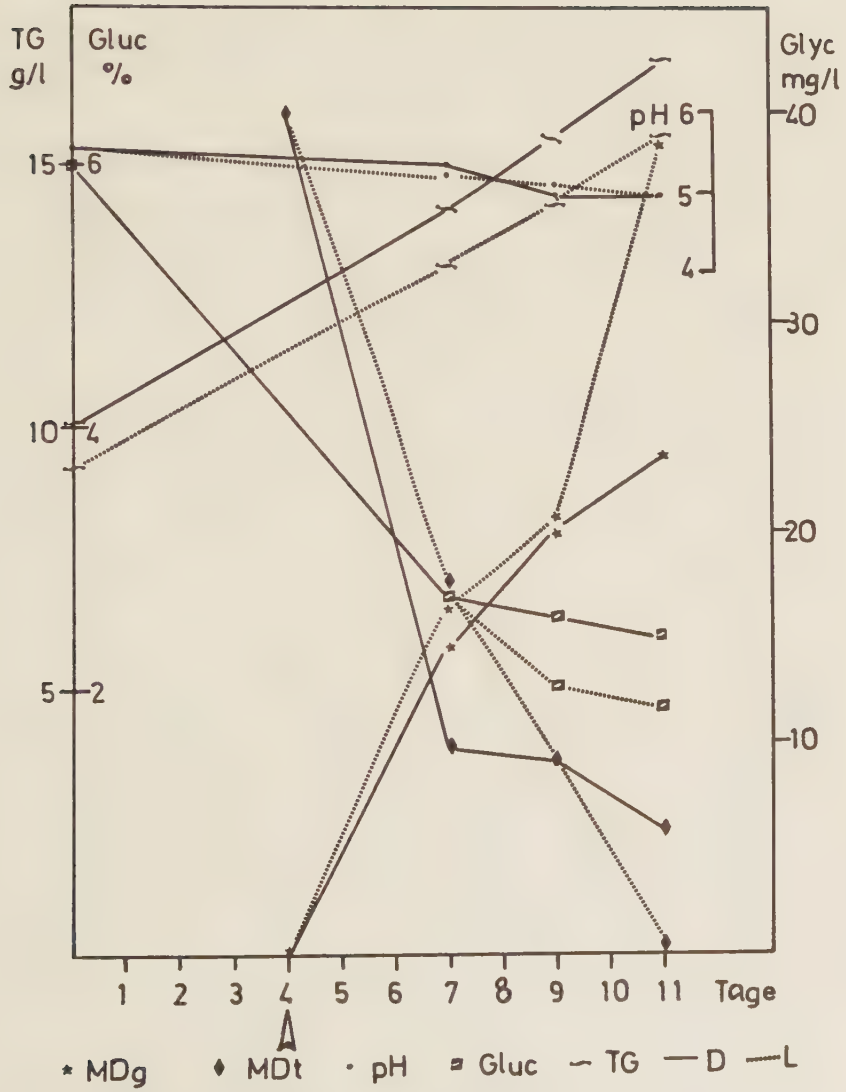


Abb. 10 Zellstamm 10/56-S-50 D und L

Zellstamm 10/56 -S- 70

Dieser Stamm wurde von Teilen des Blütenstengels 70 cm unterhalb der Stengelspitze angelegt.

Die Dunkelkultur war in der 35. Passage, die Animpfmenge betrug 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,162 g TG). Die 1-3 mm großen Zellzusammenschlüsse waren gelblich-grün gefärbt. Geerntet wurden 2,1 mal mehr an Zellmasse als Animpfmenge, es waren nur noch 1,3 g/l Restglucose vorhanden.

Der Stamm hydroxylierte in 3, 5, 7 Versuchstagen 71,0%, 59,4% und 89,0% ß-MDt zu ß-MDg. Nach 11 Versuchstagen wurde kein ß-MDt mehr im Nährmedium gefunden.

Lichtkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,50	0,3	11,0	1,7	11,7	29,0	23,7	71,0
5	4,75	1,2	12,7	2,0	9,2	23,1	28,4	59,4
7	4,75	1,3	13,3	2,1	0	0	35,5	89,0

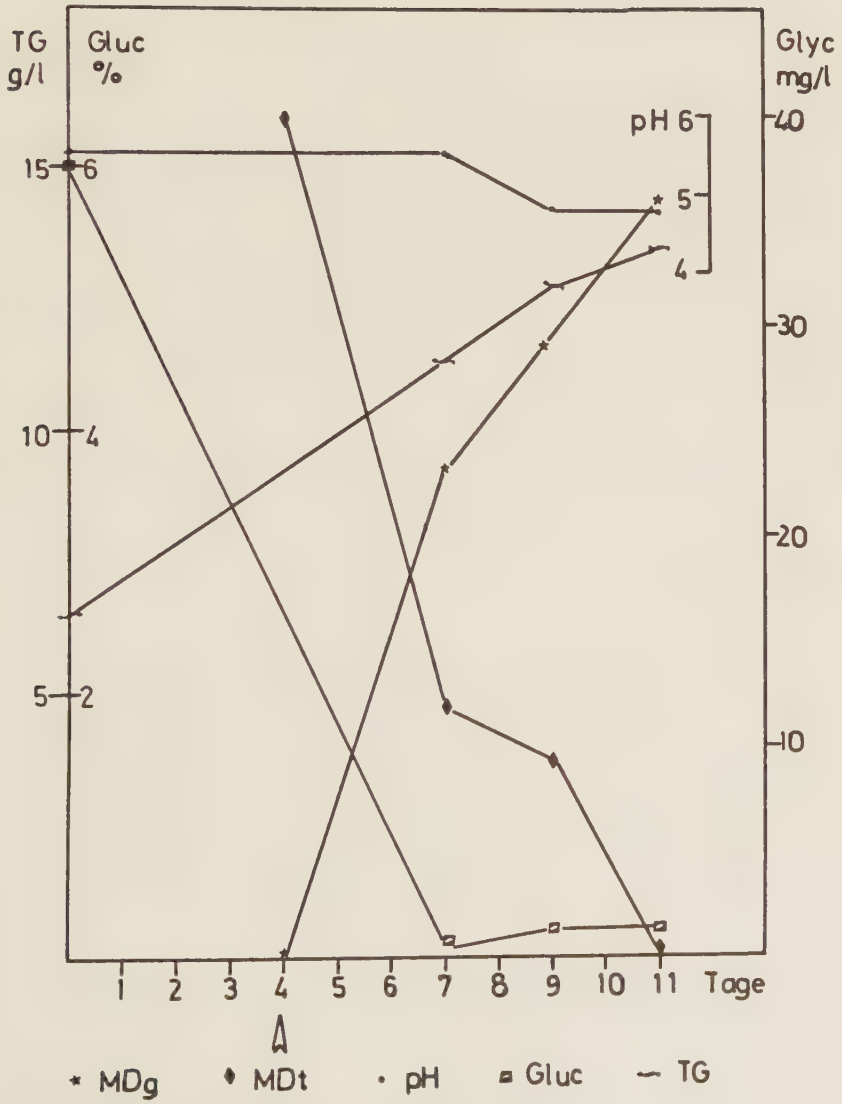


Abb. 11 Zellstamm 10/56-S-70 D

Zellstamm 10/56 Anth. 4

Für die Anlage dieses Stammes wurden die Antheren aus einer 4mm großen Blütenknospe verwendet.

Der Dunkelstamm wurde in der 33. Passage getestet, die Animpfmenge betrug 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,165 g TG). Die gelben Zellaggregate hatten einen Durchmesser von 2-4 mm. Die Zellmasse hatte sich in 11 Tagen auf das 2,7 Fache vermehrt. Im Nährmedium gab es keine Restglucose mehr.

Nach 3, 5, 7 Versuchstagen wurden 82,0%, 83,5% und 90,0% ß-MDg gemessen. Es wurde kein ß-MDt mehr gefunden.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,80	0	11,8	1,8	0	0	32,8	82,0
5	5,75	0	15,1	2,3	0	0	33,4	83,5
7	5,70	0	17,7	2,7	0	0	35,8	90,0

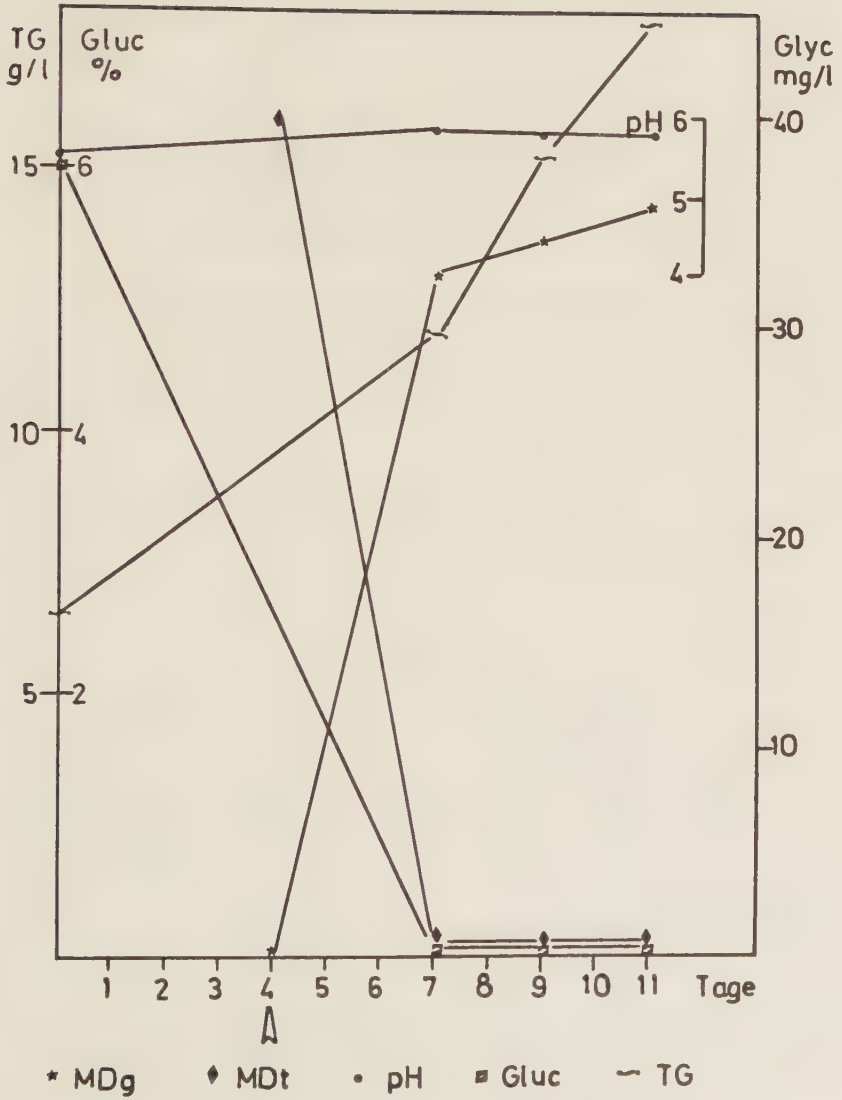


Abb. 12 Zellstamm 10/56 Anth.4 D

Zellstamm 10/56 Anth. 5

Bei der Anlage dieses Stammes wurde von den Antheren aus einer 5 mm großen Blütenknospe ausgegangen. Dieser Stamm wurde in Licht und Dunkelkultur untersucht.

In der 49. Passage wurde die Lichtkultur getestet, die Animpfmenge war 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,159 g TG). Die Kultur hatte 2-3 mm große, grünliche Zellaggregate.Der Stamm war gut gewachsen, die Zellmasse betrug das 2,6 Fache, im Nährboden war noch 19,9 g/l Restglucose vorhanden.

Die Dunkelkultur wurde in der 35. Passage getestet. Angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,145 g TG). Die Kultur hatte 2-3 mm große hellgrüne Zellaggregate.Die Zellmasse betrug nach 11 Tagen das 3,1 Fache. Es wurde 12,5 g/l Restglucose gemessen.

Nach 3, 5, 7 Versuchstagen wurden 10,5%, 19,5% und 28,7% ß-MDg bei der Lichtkultur und 35,0%, 53,5% und 85,7% bei der Dunkelkultur gemessen.

Lichtkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,20	22,4	13,4	2,1	29,6	74,0	4,2	10,5
5	5,40	19,6	16,3	2,5	24,9	62,0	7,8	19,5
7	5,25	19,0	16,4	2,6	20,0	50,0	11,5	28,5

Dunkelkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	6,00	20,5	14,2	2,4	20,1	50,5	14,0	35,0
5	5,15	17,5	15,7	2,7	12,2	30,4	21,4	53,5
7	5,25	12,5	18,0	3,1	3,4	8,0	34,3	85,7

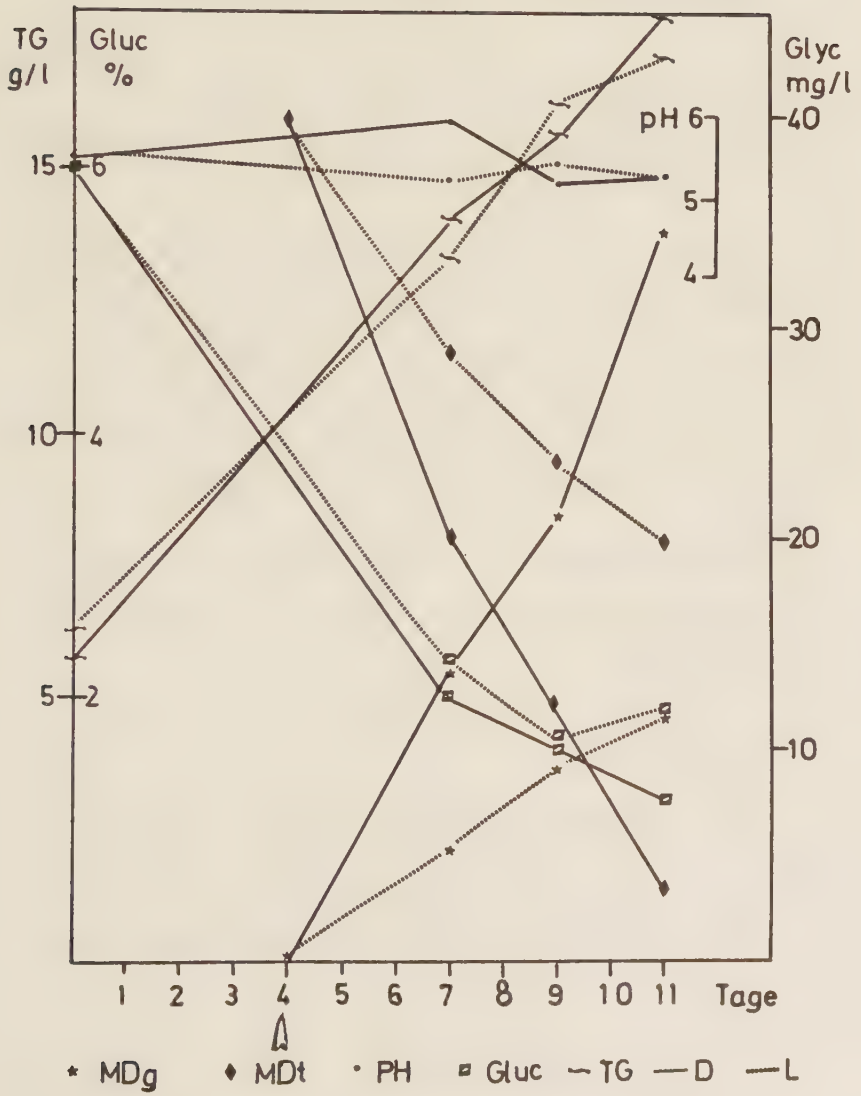


Abb. 13 Zellstamm 10/56 Anth.5 D und L

Zellstamm 10/56 ST30

Dieser Stamm wurde aus dem Seitentrieb angelegt. Gewebebezirke 30 cm unterhalb der Triebspitze wurde zur Callusanlage verwendet.

Die Dunkelkultur wurde in der 33. Passage getestet. Angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,150 g TG). Das Gewebe war gelblich, bestehend aus 1-3 mm großen Zellaggregaten. Der Dunkelstamm war gut gewachsen, geerntet wurde das 3,0 Fache an Zellmasse im Vergleich zur Animpfmenge. Restglucose war nur 9 g/l vorhanden.

Nach 3, 5, 7 Versuchstagen wurde 67,0%, 95,0% und 88,0% ß-MDg gemessen. Nach 5 Tagen wurde kein ß-MDt im Kulturfiltrat gefunden.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,40	10,0	13,7	2,3	1,9	5,0	26,8	67,0
5	5,35	9,6	16,6	2,8	0	0	35,0	88,0
7	5,35	9,0	18,0	3,0	0	0	38,2	95,0

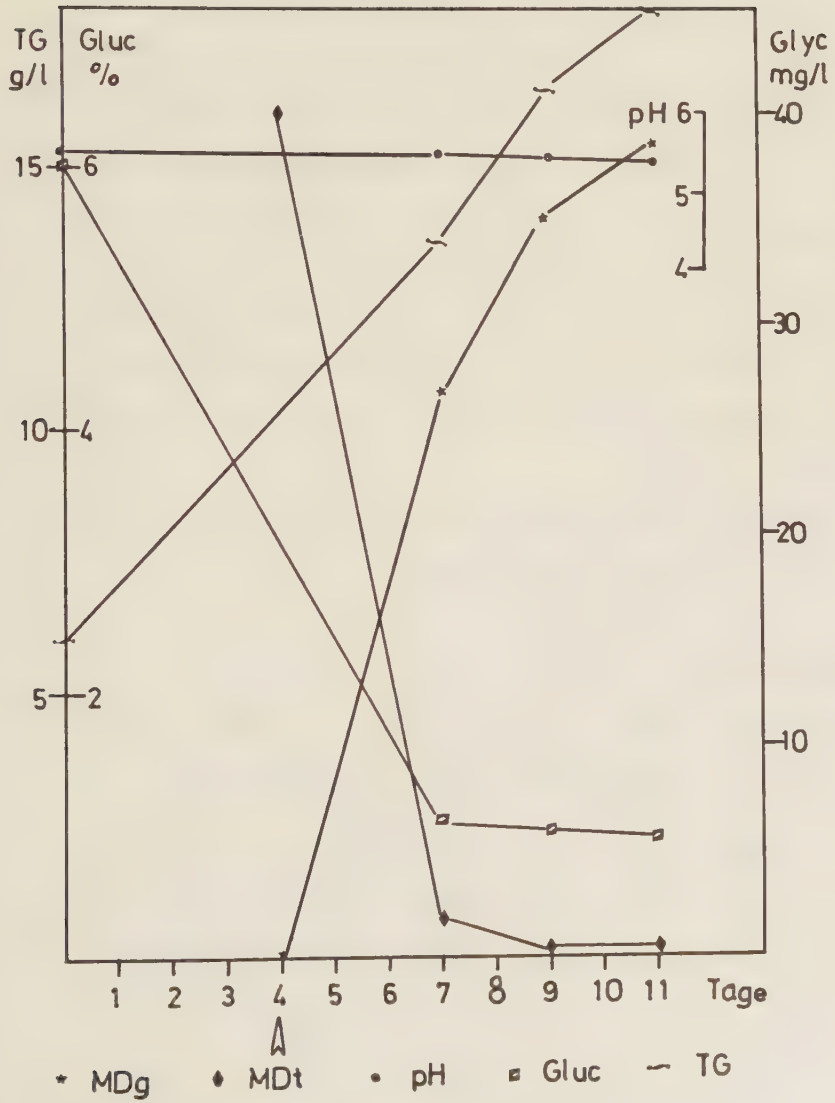


Abb. 14 Zellstamm 10/56 ST30 D

Zellstamm 2478 A 8

Von Antheren aus einer 8 mm großen Blütenknospe wurde dieser Stamm angelegt. Der Digoxingehalt der Ausgangspflanze war 0,550%, die Hydroxylierungsrate war 31 %.

Getestet wurde der Dunkelstamm in der 3. Passage, angeimpft mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,234 g TG). Das Gewebe war hellbeige gefärbt mit 2-3 mm großen Zellaggregaten. Die Gewebekultur am Ende der Inkubation hatte ihre Zellmasse verdoppelt. Es wurden 11,9 g/l Restglucose im Nährmedium gemessen.

Ab Zugabe der β-MDt-Lösung nach 3, 5 und 7 Tagen wurden 17,1%, 33,5% und 41,7% β-MDg gemessen.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	β-MDt		β-MDg		E/A
Tage		g/l	g/l	mg/l	%	mg/l	%	
3	5,35	19,2	14,9	20,1	50,3	7,1	17,1	1,6
5	5,20	15,4	15,9	16,2	40,5	13,4	33,5	1,7
7	5,30	11,8	17,8	10,0	25,0	16,7	41,7	1,9

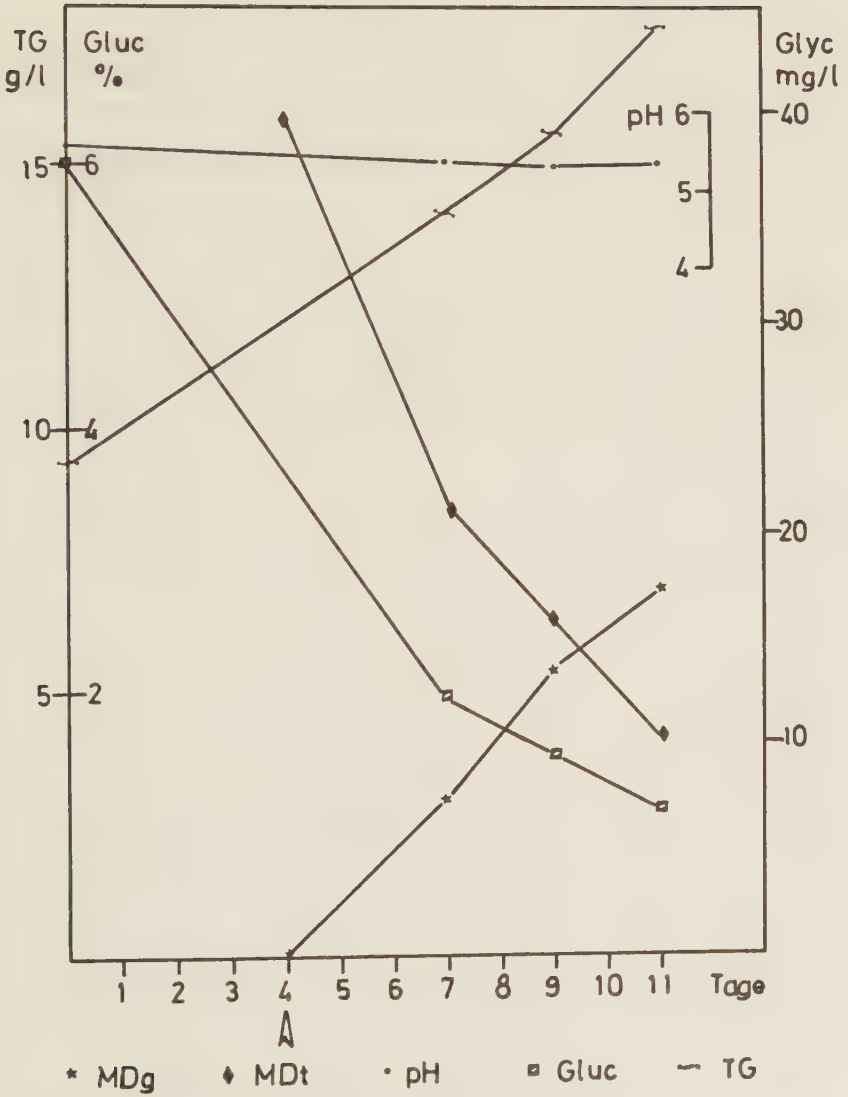


Abb. 15 Zellstamm 2478 A8 D

Zellstamm 2500 A 5

Bei der Anlage dieses Stammes wurde von Antheren aus einer 5mm großen Blütenknospe ausgegangen. Der Digoxingehalt der Ausgangspflanze war 0,64%, die Hydroxylierungsrate war 9 % .

In der 3. Passage wurde die Dunkelkultur getestet, die Animpfmenge war 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,206 g TG). Die Kultur hatte 1-3 mm große, gelbgrüne Zellaggregate. Die Zellmasse betrug das 2,0 Fache. Es wurden 12,5 g/l Restglucose gemessen.

Das zugesetzte Substrat war nach 3, 5 und 7 Versuchstagen zu 31,6%, 48,7% und 62,3% zu β-MDg hydroxyliert worden.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	β-MDt		β-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,30	21,4	12,4	1,5	17,3	43,2	12,7	31,6
5	5,00	16,8	14,1	1,7	10,3	25,7	19,4	48,7
7	4,95	12,5	16,5	2,0	5,6	14,0	24,9	62,3

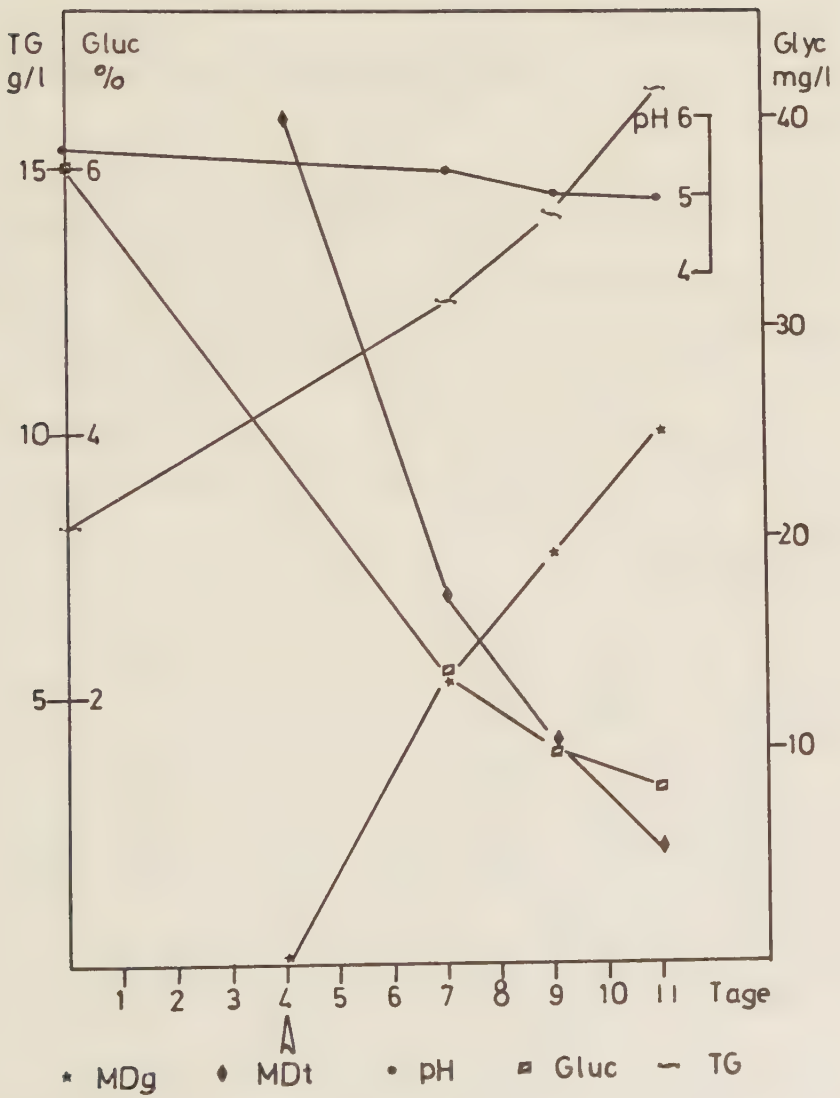


Abb. 16 Zellstamm 2500 A5 D

Zellstamm 4025 Bl.

Ausgangsmaterial für diesen Stamm war ein Blatt der Blattrosette.

Die Dunkelkultur war in der 3. Passage, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,205 g TG). Das Gewebe war gelblich, die einzelnen Aggregate hatten eine Größe von 1-3 mm. Die Gewebemasse am Ende des Versuchs war auf das 2,4 Fache angewachsen. Von Glucose waren noch 12,5 g/l vorhanden.

Der Stamm hydroxylierte innerhalb 3, 5 und 7 Versuchstagen 49,1%, 75,5 % und 85,3 % des zugesetzten ß-MDt zu ß-MDg.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	4,85	13,8	16,4	2,0	24,8	62,0	19,6	49,1
5	4,82	8,7	17,5	2,1	1,8	4,5	30,2	75,5
7	4,80	3,4	18,0	2,2	0,9	2,3	34,1	85,3

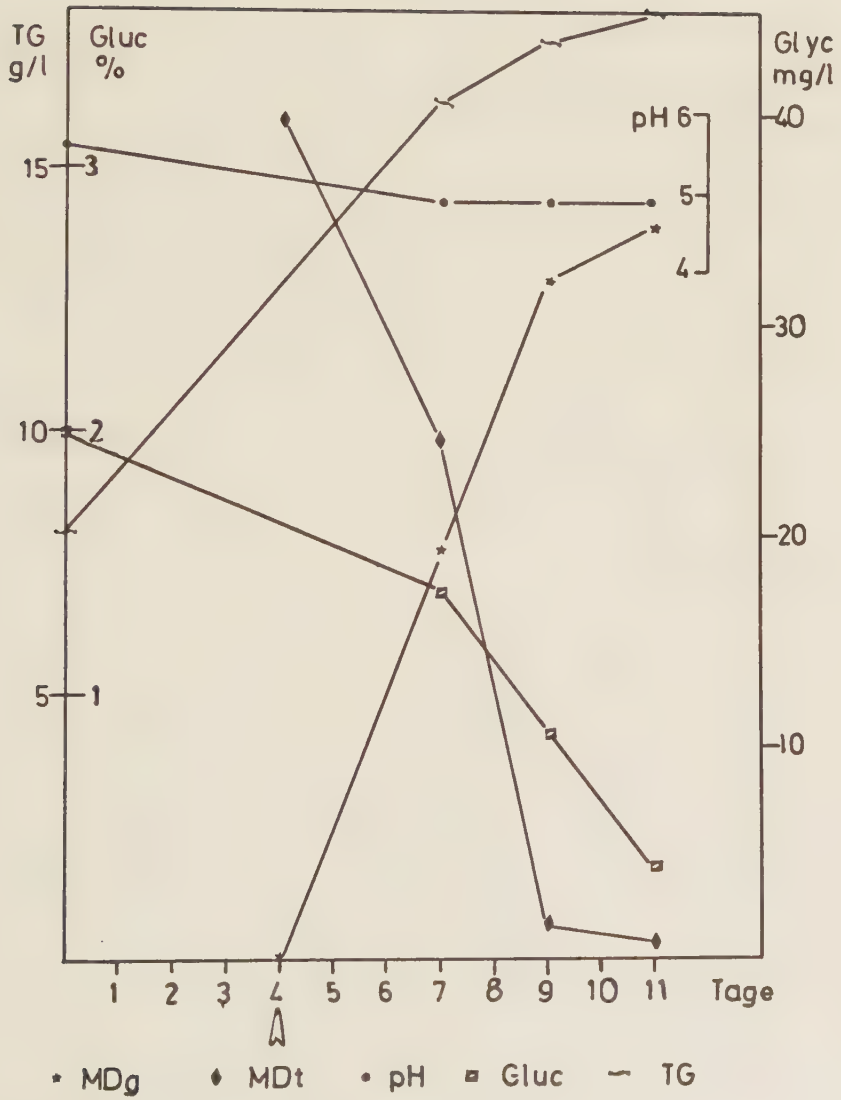


Abb. 17 Zellstamm 4025 Bl D

Zellstamm 30625 - 10- 10- 3

Für die Anlage dieses Stammes wurde die Anthere aus einer 3mm großen Blütenknospe verwendet.

Die Dunkelkultur war in der 3. Passage, angeimpft mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,197 g TG). Das Gewebe war hellgelb, die Zellaggregate hatten einen Durchmesser von 1-3 mm. Es wurde am Ende der Inkubation das 2,2 Fache an Gewebe gefunden. Von der Glucose waren noch 3,0 g/l vorhanden.

Nach 3, 5 und 7 Versuchstagen war 11,6%, 23,4%, 51,8% ß-MDt zu ß-MDg umgewandelt worden.

Dunkelkultur :

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	5,10	13,3	13,4	1,7	31,2	78,1	4,6	11,6
5	4,98	8,9	15,0	1,9	28,6	71,4	9,3	23,4
7	5,00	3,0	17,3	2,2	21,5	53,8	20,7	51,8

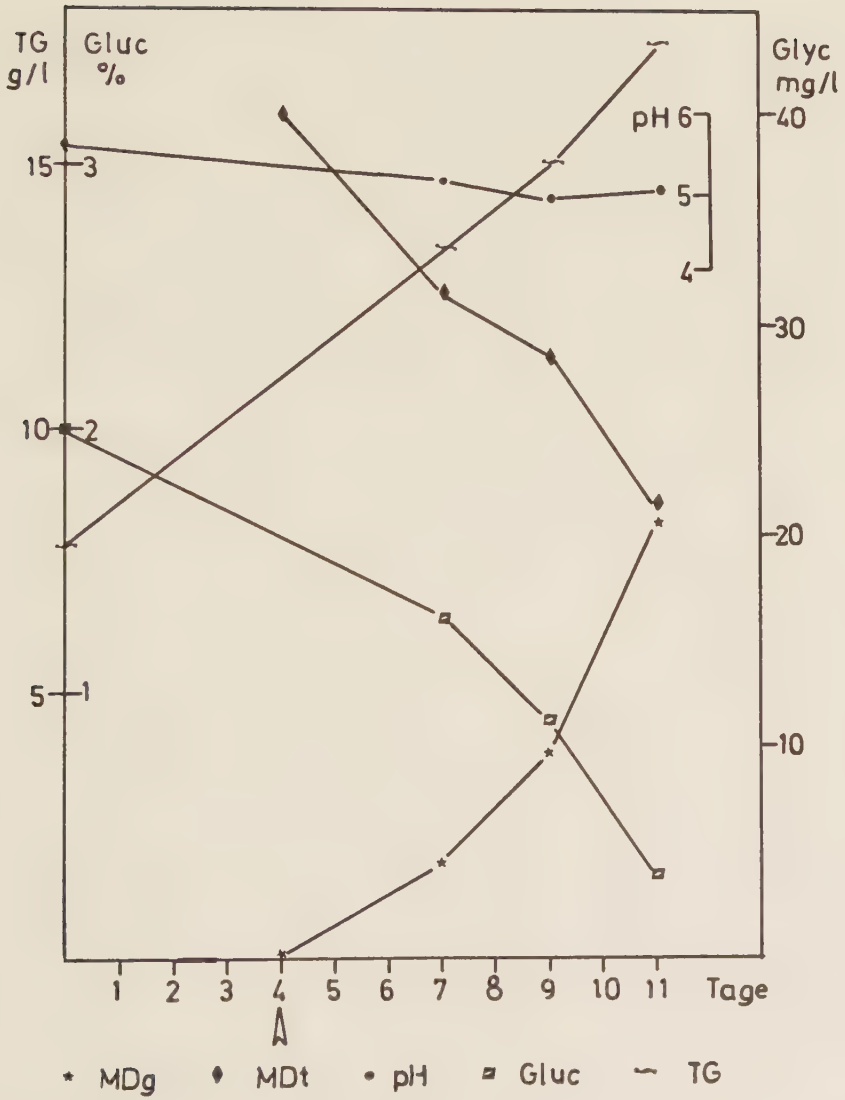


Abb. 18 Zellstamm 30625-10-10-3 D

Zellstamm 30673 - 14- 7- 5

Bei der Anlage dieses Stammes wurde von Antheren aus einer 5 mm großen Blütenknospe ausgegangen.

Der Dunkelstamm wurde in der 3. Passage getestet, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,159 g TG). Die 1-2 mm großen Zellaggregate waren hellbeige. Das Zellgewebe war auf das 2,5 Fache der Animpfmenge angewachsen. Es waren noch 6,9 g/l Restglucose vorhanden.

Die Biotransformationsrate von ß-MDt zu ß-MDg war nach 3, 5 und 7 Versuchstagen 78,5%, 84,1% bzw. 80,5%. Nach 6 Tagen wurde kein ß-MDt im Nährmedium gefunden.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	4,70	12,4	12,7	2,0	2,7	6,9	31,4	78,5
5	4,82	9,3	14,6	2,3	0	0	33,6	84,1
7	4,83	6,9	15,9	2,5	0	0	32,2	80,5

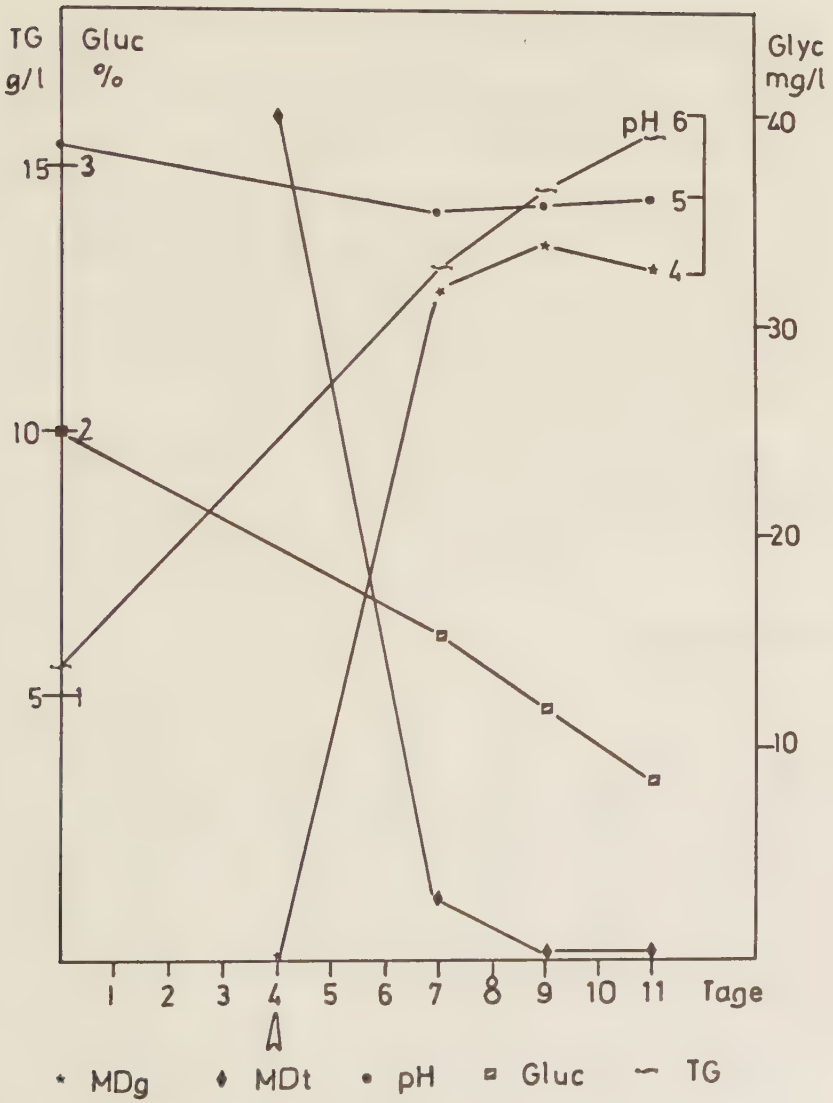


Abb. 19 Zellstamm 30673-14-7-5 D

Zellstamm 30690 - 21- 10- 4

Für die Anlage dieses Stammes wurden die Antheren aus einer 4mm großen Blütenknospe verwendet.

Getestet wurde der Dunkelstamm in der 3. Passage, angeimpft mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,195 g TG). Das Gewebe war gelblich gefärbt mit 1-3 mm großen Zellaggregaten. Die Gewebemasse am Ende des Versuches war auf das 2,6 Fache angewachsen. Es waren noch 5,5 g/l Glucose vorhanden.

Ab Zugabe der ß-MDt-Lösung wurden 3, 5, 7 Versuchstage später 78,8%, 87,0% und 97,0% ß-MDg gemessen. Nach 4 Tagen wurde kein ß-MDt mehr im Nährmedium gefunden.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,10	14,4	13,2	1,7	0	0	31,5	78,8
5	4,95	19,8	16,4	2,1	0	0	34,8	87,0
7	4,80	4,0	18,0	2,3	0	0	38,8	97,3

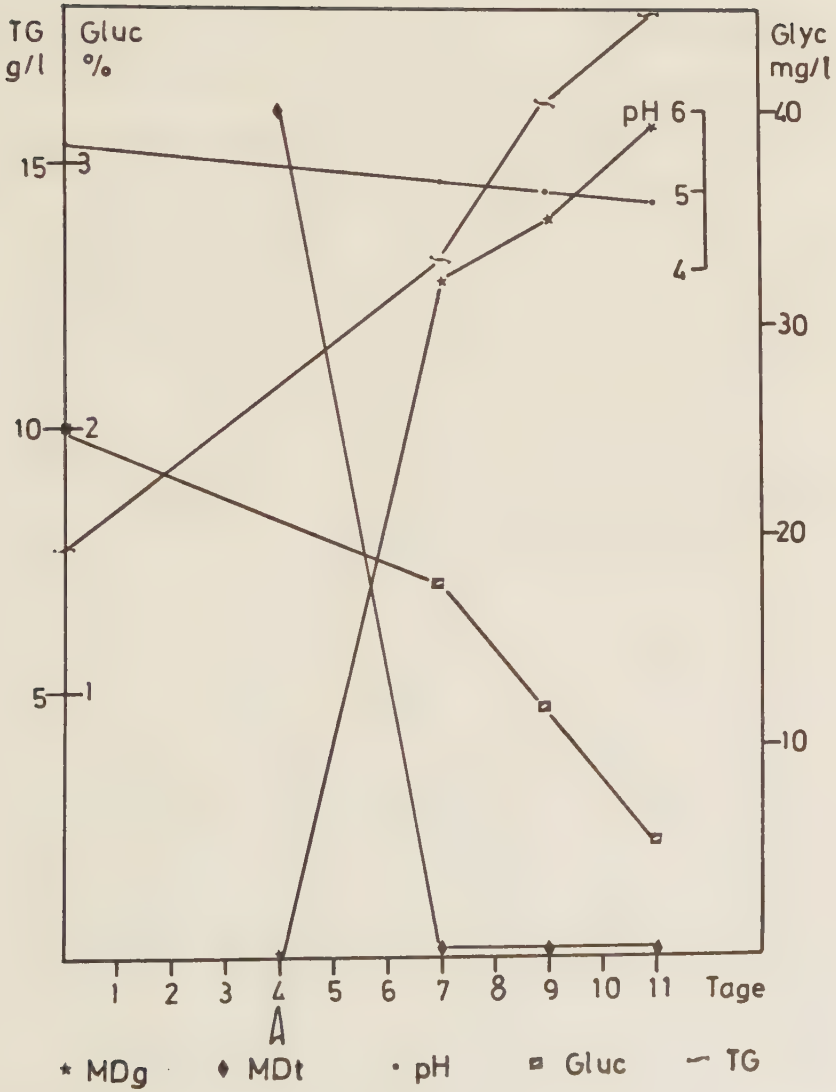


Abb. 20 Zellstamm 30690-21-10-4 D

Zellstamm 15 - 8

Die Ausgangspflanze für diesen Stamm hatte einen Digoxingehalt von 0,260%, die Hydroxylierungsrate war 42%.

In der 3. Passage wurde der Dunkelstamm getestet, angeimpft wurde mit 2,0 g (FG) Gewebe (= 0,174 g TG). Das Gewebe bestand aus 2-4 mm großen, hellgelben Zellaggregaten. Bei Versuchsende hatte das Gewebe die 2,5 Fache Masse, im Nährmedium wurden noch 5,3 g/l Glucose gemessen.

Das zugesetzte Substrat wurde in 3, 5 und 7 Versuchstagen zu 65,4%, 93,6% und 94,4% zu ß-MDg hydroxyliert. Nach 6 Tagen wurde kein ß-MDt im Nährmedium gefunden.

Dunkelkultur :

Zeit	pH	Glucose	TG	E/A	ß-MDt		ß-MDg	
Tage		g/l	g/l		mg/l	%	mg/l	%
3	5,00	13,7	13,2	1,9	4,5	11,2	26,2	65,4
5	4,95	9,2	15,3	2,2	0	0	37,5	93,6
7	4,82	5,3	17,4	2,5	0	0	37,8	94,4

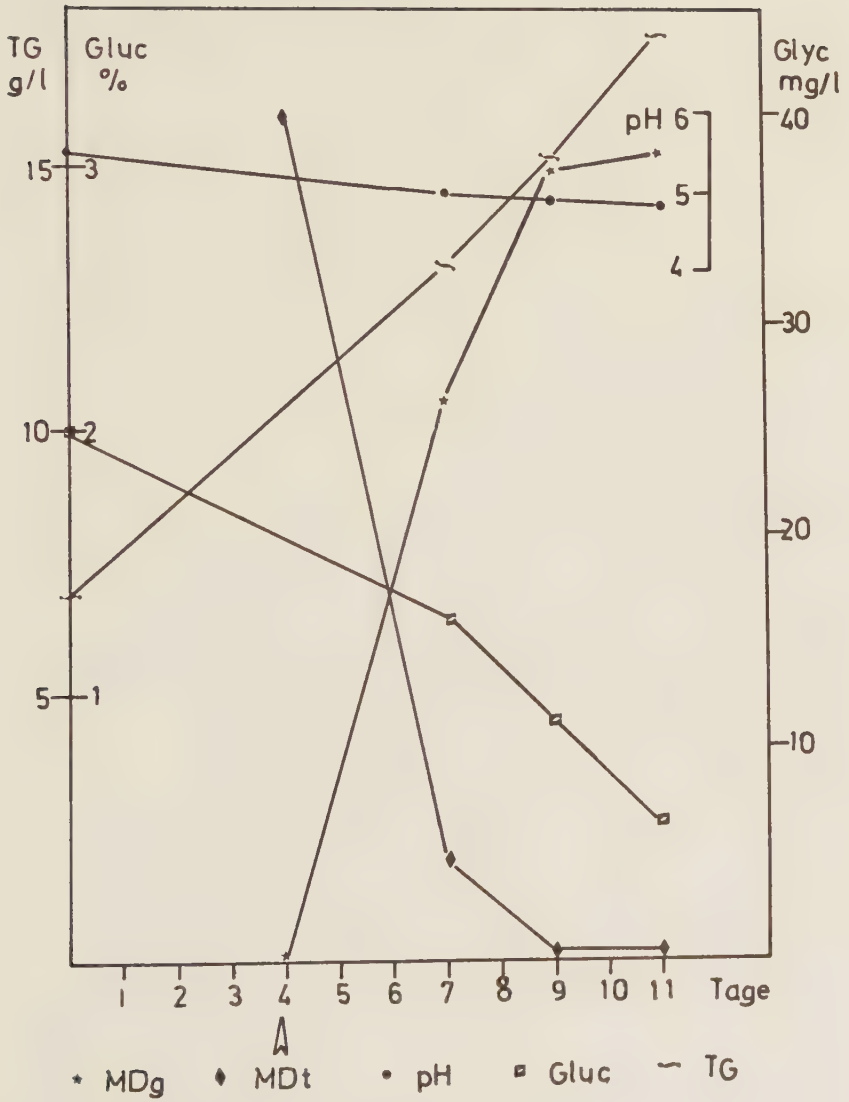


Abb. 21 Zellstamm 15-8 D

1.3 Zusammenstellung der Sreeningergebnisse

Tab. 2 Zusammenstellung der Sreeningergebnisse am 7., 9. und 11. Tag nach dem Animpfen
100 ml Kolben, 25 ml Medium, 2 g Gewebe, Zugabe von 40 mg/l ß-MDt

Zellstamm	Ausgangspf. Dg-gehalt u. Hydrox. %	7. Tag				9. Tag				11. Tag			
		ß-MDt		ß-MDg		ß-MDt		ß-MDg		ß-MDt		ß-MDg	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
10/45 L	0,455 (18)	5,4	13,6	30,5	76,0	0	0	37,8	94,5	0	0	37,3	93,2
10/52 D	0,405 (47)	26,4	66,0	8,1	20,3	14,0	35,0	16,8	42,0	0	0	35,6	89,0
10/56-S-10 D	0,455 (47)	13,1	32,3	19,5	49,0	0	0	31,9	80,0	0	0	38,3	95,7
10/56-S-20 D	0,455 (47)	10,3	25,8	26,0	65,1	0	0	34,5	86,2	0	0	37,0	92,4
10/56-S-50 L	0,455 (47)	17,3	43,0	17,2	43,0	8,6	22,0	21,5	54,0	0	0	39,0	97,5
10/56-S-70 D	0,455 (47)	11,7	29,2	28,4	71,0	9,2	23,1	23,7	59,4	0	0	35,5	89,0
10/56 Anth.4 D	0,455 (47)	0	0	32,9	82,0	0	0	33,4	83,5	0	0	35,8	90,0
10/56 ST30 D	0,455 (47)	1,9	5,0	26,9	67,0	0	0	38,2	95,0	0	0	35,0	88,0
30673-14-7-5 D		2,7	6,9	31,4	78,5	0	0	33,6	84,1	0	0	32,2	80,5

30690-21-10-4D		0	0	31,5	78,8	0	0	34,8	87,0	0	0	38,8	97,0
15-8 D	0,260 (42)	4,5	11,2	26,2	65,4	0	0	37,5	93,6	0	0	37,8	94,4
GPR2 D		0	0	33,6	84,0	0	0	39,4	98,4	0	0	35,6	89,0
10/56-S-50 D	0,455 (47)	9,9	25,0	14,2	36,0	8,6	22,0	20,3	51,0	5,6	14,0	23,8	60,0
10/56 Anth.5 D	0,455 (47)	20,1	50,0	14,0	35,0	12,2	30,4	21,4	53,5	3,4	8,0	34,3	85,7
4025 B1 D		24,8	62,0	19,6	49,1	1,8	4,5	30,2	75,5	0,9	2,3	34,1	85,3
2500 A5 D	0,640 (9)	17,3	43,2	12,7	31,6	10,3	25,7	19,4	48,7	5,6	14,0	24,9	62,3
10/52 L	0,405 (47)	18,6	47,0	11,1	28,0	15,1	38,0	20,7	52,0	7,6	19,0	22,5	56,4
9/50 D	0,450 (41)	20,2	50,5	5,5	13,7	19,2	50,0	7,8	19,4	16,0	40,0	22,0	55,0
10/56 D	0,455 (47)	27,5	68,8	7,9	20,0	26,8	67,0	8,2	20,5	13,3	33,0	21,1	53,0
30625-10-10-3D		31,2	78,1	4,6	11,6	28,6	71,4	9,3	23,4	21,5	53,8	20,7	51,8
10/56-S-10 L	0,455 (47)	22,1	55,0	10,3	25,2	15,2	38,0	17,3	42,2	14,0	34,8	18,2	45,4
3336 A6 D	0,470 (16)	26,1	65,3	3,6	9,0	24,5	61,3	7,0	17,6	12,5	31,2	16,5	42,0
2478 A8 D	0,550 (31)	20,1	50,3	7,1	17,1	16,2	40,3	13,4	33,5	10,0	25,0	16,7	41,7
10/56 ST40 L	0,455 (47)	21,0	52,6	10,4	26,0	20,6	51,5	11,2	27,9	12,9	31,0	15,9	39,9
10/56 ST20 L	0,455 (47)	26,2	65,6	4,5	11,3	23,2	58,0	6,7	16,8	13,5	33,7	14,4	35,9
9N/229 L	0,415 (11)	25,9	64,7	3,1	8,1	17,4	43,0	12,5	31,0	19,9	50,0	14,7	37,0

Zellstamm	Ausgangspf. Dg-gehalt u. Hydrox. %	7. Tag				9. Tag				11. Tag			
		β-MDt		β-MDg		β-MDt		β-MDg		β-MDt		β-MDg	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
3336 S D	0,470 (16)	30,2	75,7	6,2	15,4	27,8	69,5	10,1	25,3	22,1	55,2	14,7	37,0
516-5 D		19,9	49,8	6,7	16,8	31,2	78,0	3,2	8,0	27,1	67,8	13,0	32,1
9/50 D	0,450 (41)	28,6	71,6	0	0	29,2	73,0	0	0	20,8	52,0	12,5	31,2
2384 S D	0,670 (14)	34,6	86,6	2,3	5,7	32,3	80,8	7,3	18,2	27,5	68,9	12,1	30,3
10/56 Anth.6 D	0,455 (47)	29,3	73,0	3,8	9,4	20,4	51,0	10,1	25,3	14,9	37,2	11,7	29,2
10/56 Anth.4 L	0,455 (47)	29,6	74,0	4,2	10,5	24,9	62,0	7,9	19,5	20,0	50,0	11,5	28,7
30673-14-7-2 D		35,7	89,2	1,0	2,5	34,3	85,7	3,7	9,2	25,6	64,1	11,3	28,2
2473 A4 D	0,590 (28)	28,6	71,5	4,2	10,5	25,5	63,6	8,7	21,7	20,5	51,2	11,1	27,8
413 D	0,150 (6)	33,0	82,4	4,9	10,9	30,9	77,4	6,8	17,4	26,4	66,1	11,2	27,9
2500 S D	0,640 (9)	31,5	78,8	4,6	11,6	28,3	70,7	6,8	17,4	24,3	60,8	10,7	26,7
597 S D		32,2	80,6	3,7	9,3	31,7	79,2	7,3	18,2	27,0	70,5	10,4	26,1
2478 Na D	0,550 (31)	31,3	78,3	3,3	8,3	27,9	69,7	6,4	16,1	24,5	61,3	9,4	25,4
30614-9-14-6 D		31,6	79,1	0	0	29,8	74,5	2,7	6,9	22,1	55,4	9,6	25,9

2478 S D	0,550 (31)	34,9 87,3	2,3 5,7	31,3 78,3	5,1 12,8	28,6 71,5	8,9 22,3
602 S D		34,2 85,6	3,9 9,8	31,0 77,5	5,9 14,7	26,2 65,4	8,9 22,3
4019 B1 D	0,500 (14)	25,1 62,7	0,9 2,0	27,2 68,0	7,4 18,6	26,1 65,3	8,1 20,3
10/56 Anth.6 L	0,455 (47)	27,1 70,0	2,8 7,0	24,3 60,7	6,8 17,0	21,4 53,7	8,1 20,3
413 B1 D	0,150 (6)	31,9 74,0	1,2 3,0	29,0 72,0	4,3 10,7	25,1 62,8	7,8 19,5
419 S D	0,290 (23)	33,3 83,1	2,3 5,6	31,7 79,3	4,5 9,3	28,1 70,3	7,7 19,3
1318 A4 D		30,9 77,3	2,1 5,2	27,3 68,3	5,1 12,6	23,5 58,8	7,6 19,0
20/231 L	0,095 (3)	28,2 70,6	1,6 4,1	25,2 63,0	6,7 17,0	26,0 65,0	7,5 18,7
2473 Na D	0,590 (28)	31,3 78,3	1,9 4,7	26,9 67,2	4,2 10,6	25,5 63,8	7,3 18,3
2384 A4 D	0,670 (14)	28,0 70,0	1,4 3,6	24,7 61,7	5,4 13,5	21,8 54,5	7,4 18,6
4250 B1 D	0,460 (21)	35,6 89,0	0 0	33,7 84,3	5,6 14,1	30,2 75,4	7,1 17,8
601 A5 D		29,3 73,2	3,2 8,0	24,4 61,0	5,4 13,5	22,7 56,7	6,7 16,8
602 B1 D		30,4 76,1	1,6 4,1	28,3 70,1	3,9 9,8	25,4 63,4	6,8 16,9
3488 A8 D	0,400 (24)	32,5 80,1	3,1 7,7	24,2 61,5	5,2 13,0	26,3 66,0	5,9 14,8
1318 S D		32,6 81,5	0,5 1,2	34,7 79,2	2,7 6,6	28,2 78,2	5,4 13,6
2311 A7 D	0,590 (18)	29,8 74,5	0,9 2,3	27,8 69,6	3,4 8,6	26,2 65,5	5,1 12,8
30689-20-8-4 D		27,6 69,1	2,4 6,1	29,0 72,5	4,1 10,3	32,9 82,3	4,5 11,2

Zellstamm	Ausgangspf. Dg-gehalt u. Hydrox. %	7. Tag				9. Tag				11. Tag			
		ß-MDt		ß-MDg		ß-MDt		ß-MDg		ß-MDt		ß-MDg	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
30614-9-14-7 D		39,7	99,1	0	0	35,9	89,8	0	0	37,0	92,5	4,2	10,6
55-7 D	0,150 (42)	25,2	62,6	0	0	26,3	65,8	3,1	7,7	26,0	65,8	4,1	10,3
3488 S D	0,400 (24)	32,4	80,1	0	0	25,8	61,4	3,4	8,4	24,1	60,5	4,0	10,0
2502 S D		34,2	85,6	0	0	35,2	87,9	2,0	5,0	33,6	84,1	3,6	9,0
3490 S D		24,1	60,3	0	0	29,3	73,2	2,1	5,3	28,1	70,3	3,4	8,6
4021 S D		36,3	90,7	0	0	36,4	91,0	2,8	6,7	36,0	90,0	2,9	7,3
9N/215 L	0,410 (41)	27,8	69,6	1,4	3,4	30,9	77,3	1,5	3,6	31,3	78,2	2,2	5,5
30673-22-6-3 D		36,6	91,6	0	0	29,7	74,3	0	0	30,2	75,5	2,1	5,3
4019 S D	0,500 (14)	23,7	59,0	0,8	1,9	28,5	71,3	1,7	4,4	29,8	74,4	1,9	4,6
130-6 D		22,3	55,7	1,4	3,6	20,1	50,2	1,6	4,1	19,8	48,4	1,7	4,3
228-7 D	0,165 (4)	26,1	65,9	0	0	18,5	46,7	0,3	0,7	25,4	63,4	1,6	3,9
130-8 D		26,2	65,5	0	0	27,5	68,8	1,4	3,4	27,3	68,3	1,4	3,5
Tref.6 D		18,0	45,0	0	0	11,5	28,6	1,2	2,9	10,3	25,9	1,3	3,3

285 D		31,4	87,6	0	0	33,7	82,1	1,2	2,9	33,0	82,6	0,8	2,0
2311 S D	0,590 (18)	38,0	95,0	0	0	38,9	97,0	0	0	35,2	87,6	0,7	1,8
10/56 L	0,455 (47)	39,0	97,0	0	0	31,2	78,0	0	0	19,7	50,0	0	0
3336 Na D	0,470 (16)	38,0	95,0	0	0	36,4	91,0	0	0	36,0	90,0	0	0
9N/218 L	0,320 (43)	34,3	85,7	0	0	31,2	78,0	0	0	22,7	56,8	0	0
21/425 L	0,335 (44)	39,8	99,3	0	0	35,2	88,7	0	0	36,2	90,5	0	0
419 B1 D	0,290 (23)	31,3	78,3	0,9	2,2	28,7	71,7	0	0	30,0	75,1	0	0
508 D		39,2	98,0	0	0	39,0	97,5	0	0	39,8	99,5	0	0
30625-10-2-4 D		37,8	94,6	0	0	32,6	81,6	0	0	39,1	98,0	0	0
30614-9-14-4 D		37,9	94,9	0	0	36,7	91,8	0	0	35,2	87,9	0	0
30673-14-6-2 D		34,7	86,9	0	0	39,5	98,7	0	0	39,7	99,3	0	0
4021 B1 D		30,8	77,0	0	0	28,8	70,4	0	0	25,3	63,3	0	0
4069 B1 D		37,5	93,9	0	0	39,9	99,0	0	0	25,9	65,0	0	0
Tü-La-1-7 D		14,8	37,0	0	0	24,6	61,4	0	0	35,9	89,8	0	0

1.4 Diskussion der Screeningversuche

Von 47 verschiedenen Ausgangspflanzen wurden mehr als 80 verschiedene Zellkulturen angelegt. Der Screeningversuch, im 100 ml Kolben ausgeführt, zeigte ähnliche Ergebnisse wie bereits von Friedrichson (1979) und Baumann (1980) beschrieben.

Die Hydroxylierungsraten zeigten, daß keine eindeutige Abhängigkeit besteht zwischen dem Digoxingehalt in der intakten Pflanze und der Fähigkeit der Zellkulturen zugesetztes ß-Methyldigitoxin in 12 ß Stellung zu hydroxylieren. Die Ausgangspflanzen der hydroxylierenden Stämme hatten eine hohe Hydroxylierungsrate und einen hohen Digoxingehalt. Aber es konnte nicht bei allen gut hydroxylierenden Pflanzen auch eine Hydroxylierung in deren Gewebekultur festgestellt werden. (Tabelle 2)

Zellkulturen die aus verschiedenen Organen ein und derselben Ausgangspflanze angelegt wurden zeigten unterschiedliche Hydroxylierungsaktivität. Die Hydroxylierungsaktivität hängt also nicht nur von der Biotransformationsaktivität der Ausgangspflanze ab, sondern vielmehr von einer Vielzahl von Parametern die im folgenden beschrieben werden sollen.

Von der Pflanze 10/56 wurden Zellkulturen aus der Blattrosette, dem Blütenstengel, den Antheren und den Seitentrieben angelegt. Betrachtet man das Biotransformations-

ergebnis von den Zellkulturen die aus Pflanze 10/56 gewonnen wurden so kommt man zu folgendem Ergebnis : (siehe Seite 31 bis 47) Am schlechtesten hydroxylierte der Stamm, der aus der Blattrosette angelegt wurde. Er zeigte nach 8 Versuchstagen keine Aktivität als Lichtkultur . Alle anderen Zellkulturen zeigten eine wesentlich bessere Transformationsaktivität. Die Kulturen mit der höchsten Hydroxylierungsrate stammten aus jungem Pflanzengewebe. Es sind dies Kulturen welche aus Seitentrieben angelegt wurden.

Aus Biotransformationsergebnissen von Zellkulturen der Pflanze 10/56 kann man erkennen, daß die Hydroxylierungsaktivität von Zellkulturen, welche aus Antheren von Blütenknospen gezüchtet werden, um so größer ist je kleiner der Durchmesser der Blütenknospe ist.

Zellstamm	Ausgangspflanze Dg-gehalt %	Hydrox. %	MDg in der Kultur am 11. Tag mg/l	%
10/56 Anth.4 D.	0,455	47	35,8	90,0
10/56 Anth.5 D.	0,455	47	34,3	85,7
10/56 Anth.6 D.	0,455	47	11,7	29,2

Der Stamm 3336 A6, welcher von Antheren einer 6 mm großen Blütenknospe angelegt wurde zeigt bessere Hydroxylierungsraten als die entsprechenden Stämme, die von Narbe oder Stengel angelegt wurden.

Zellstamm	Ausgangspflanze		MDg in der Kultur am 11. Tag	
	Dg-gehalt %	Hydrox. %	mg/l	%
3336 A6 D.	0,470	16	16,5	42,0
3336 S D.	0,470	16	14,7	37,0
3336 Na D.	0,470	16	0	0

Von großer Bedeutung für die Hydroxylierungsaktivität pflanzlicher Zellkulturen ist der Einfluß von Medium und Kulturbedingungen, wie von Heins (1978) bereits beschrieben.

Alle in den Umwandlungsversuchen erhaltenen stammspezifischen Glykosidmuster gelten ausschließlich für die verwendeten Nährmedien. Zunächst muß bei der Kultivierung eine gewisse Selektion auf Wachstum in Kauf genommen werden. Dabei sind optimale Milieubedingungen für eine Biotransformation - speziell für eine 12 ß Hydroxylierung nicht immer gegeben.

Zellstamm 10/45 wurde bereits von Baumann (1980) getestet. Er konnte keine Biotransformationsaktivität feststellen. Die Hydroxylierungsaktivität desselben Stammes war im vorab beschriebenen Versuch aufgrund eines anderen Mediums sehr hoch. Ab Zugabe von ß-MDt Lösung wurden nach 4, 6, 8, Versuchstagen 76%, 94,5%, 93,2% ß-MDg gemessen. Nach 6 Tagen wurde kein ß-MDt mehr gefunden.

Weiter muß der Effekt von Licht und Dunkelheit auf die

Hydroxylierungskapazität bedacht werden.

Um die Frage abzuklären, inwieweit die 12 ß Hydroxylierung vom Licht abhängig ist wurden die Zellstämme 9/50, 10/52, 10/56, 10/56-S-10, 10/56-S-50, 10/56 Anth.5 und 10/56 Anth.6 als Licht- und Dunkelkultur im Vergleichsversuch gemessen. Nach Auswertung der Ergebnisse stellt man fest, daß die Biotransformation bei fünf der unten aufgeführten Zellstämme im Dunkeln besser abläuft, bei zwei dagegen im Licht.

Zellstamm	Dunkelkultur MDg am 11. Tag		Lichtkultur MDg am 11. Tag	
	mg/l	%	mg/l	%
9/50	12,5	31,2	22,0	55,0
10/52	35,6	89,0	22,5	56,4
10/56	21,1	53,0	0	0
10/56-S-10	38,3	95,7	18,2	45,4
10/56-S-50	23,8	60,0	39,0	97,5
10/56 Anth.5	34,3	85,7	11,5	28,5
10/56 Anth.6	11,7	29,2	8,1	20,0

Die obige Tabelle bezieht sich auf Untersuchungen in 100 ml Kolben. Im 1l Kolbenversuch bzw. bei der Fermentation zeigte Stamm 10/56-S-50 als Dunkelkultur bessere Ergebnisse als als Lichtkultur. Stamm 9/50 wurde weder im 1l Kolben noch im Fermenter getestet.

2. Weiterversuch im 1l Kolben

Diejenigen Zellstämme welche beim Sreeningversuch nach 7 Inkubationstagen eine Umsatzrate von mehr als 50 % MDt zu MDg zeigten wurden im 1l Kolben weiter getestet.

Um größtmögliche Mengen Glykosid umsetzen zu können, sind nicht die Umsatzraten 11 Tage nach einmaliger Zugabe von 40 mg/l MDt wichtig, vielmehr muß geprüft werden wie hoch die Kontinuität der Umsatzrate im Langzeitversuch ist. Im 1l Kolben wurde nun versucht über 18 Tage hinweg dauernd einen MDt Spiegel von 40 mg/l zu halten und den Gesamtumsatz im Langzeitversuch zu bestimmen. Weiterhin sollte aus wirtschaftlichen Interessen bei der industriellen Anwendung der Glucoseverbrauch bei geeigneten Zellkulturen möglichst niedrig sein.

Durchführung des Versuches :

In 1l Erlenmeyerkolben wurden 20 g frisches Gewebe (FG) auf frisches Nährmedium (300 ml) gesetzt. Jeden zweiten Tag wurde 3 ml Probe entnommen, die Glucoseabnahme, die Abnahme des Substrates sowie der MDg Gehalt gemessen. Der pH Wert konnte aufgrund des geringen Probevolumens während des Versuches nur in etwa mit einem pH-Indikatorpapier ermittelt werden. Am 18. Versuchstag war eine exakte Bestimmung mit der Glaselektrode möglich.

Durch kontinuierliche Zugabe von ß- MDt wurde versucht, dauernd einen MDt Spiegel von 40 mg/l aufrecht zu erhalten. Verbrauchte Glucose wurde als 40% ige Glucoselösung nachgefüttert, so saß immer ausreichend Zucker vorhanden war.

2.1 Ergebnisse

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse geben Auskunft über

- pH Verlauf
- Animpfmenge als Trockengewicht sowie Trockengewicht nach 18 Tagen und lassen somit Rückschlüsse über Wachstumsrate zu
- Glucosezugabe sowie Restglucose nach 18 Tagen
- β - MDt Zugaben und β - MDg Werte bis zum 18. Versuchstag

sowie Gesamtwiederfindungsrate an β MDg und β MDt.

Es wurden die folgenden Zellstämme untersucht :

Zellstamm 10/52, Dunkelkultur

Zellstamm 10/56-S- 10, Dunkelkultur

Zellstamm 10/56-S- 20, Dunkelkultur

Zellstamm 10/56-S- 70, Dunkelkultur

Zellstamm Anth. 4, Dunkelkultur

Zellstamm ST 30, Dunkelkultur

Zellstamm ST 30-Se (Selektion aus Stamm 10/56 ST 30) Dunkelkultur

Zellstamm 30673-14-7-5, Dunkelkultur

Zellstamm 30690-21-10-4, Dunkelkultur

Zellstamm 15-8, Dunkelkultur

Tab. 3 Zellstamm 10/52 D. S-Medium

Testergebnisse der 54. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			40,0				
4	5,40	24,0	80,0	0	0	28,5	71,3
6	5,20	23,4	120,0	0	0	62,8	78,5
8	5,30	20,9	160,0	16,9	14,1	86,4	72,1
10	5,20	18,8	200,0	27,5	17,2	102,4	64,0
12	5,20	17,5	200,0	50,3	25,2	117,3	58,7
14	5,10	15,1	240,0	74,1	30,8	126,7	52,8
16	5,10	12,4	240,0	38,5	19,2	124,0	62,0
18	5,12	9,8		46,3	19,3	154,2	64,2

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,10-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,1 g (6,9 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	7,8 g (26,0 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	9,8 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	240,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	154,2 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	200,5 mg/l
Wiederfindungsrate	83,5 %
Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,405%	Hydrox. 47%

Tab. 4 Zellstamm 10/56-S-10 D. S-Medium

Testergebnisse der 52. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,30	25,9	106,0	38,2	72,4	5,9	11,2
6	5,40	26,4	106,0	72,1	68,0	14,0	13,2
8	5,20	24,2	106,0	48,0	45,3	32,9	31,1
10	5,30	22,6	159,0	26,2	24,7	57,2	53,9
12	5,10	21,0	159,0	16,8	10,5	111,8	70,3
14	5,00	18,4	174,9	0	0	128,7	80,9
16	4,90	16,0	190,0	0	0	143,1	81,8
18	5,05	13,3		8,7	4,6	152,9	80,5

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,90-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,1 g (6,9 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,2 g (27,3 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	13,3 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	190,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	152,9 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	161,6 mg/l
Wiederfindungsrate	85,1 %
Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455%	Hydrox. 47%

Tab. 5 Zellstamm 10/56-S-20 D. S-Medium

Testergebnisse der 52. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			40,0				
4	5,00	24,5	80,0	0	0	38,4	96,0
6	5,10	25,7	120,0	0	0	68,3	85,4
8	5,20	23,1	160,0	5,8	4,8	98,5	82,1
10	5,00	20,5	200,0	13,2	8,2	111,7	70,0
12	5,10	19,3	240,0	36,2	18,1	124,9	62,5
14	5,20	17,4	280,0	60,5	25,2	134,7	56,1
16	5,10	14,6	280,0	91,8	32,8	142,7	51,0
18	5,16	12,3		91,0	32,5	162,8	58,2

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,20
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,6 g (5,4 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	6,5 g (21,7 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	12,3 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	280,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	162,8 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	253,8 mg/l
Wiederfindungsrate	90,7 %
Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455%	Hydrox. 47%

Tab. 6 Zellstamm 10/56-S-70 D. S-Medium

Testergebnisse der 53. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,50	21,4	106,0	42,9	81,1	4,0	7,5
6	5,40	18,9	106,0	83,8	79,1	18,5	17,5
8	5,20	16,4	106,0	74,0	69,8	27,8	22,5
10	5,30	14,0	106,0	64,4	60,8	33,0	31,1
12	5,10	11,6	159,0	54,3	51,3	39,7	25,0
14	5,00	8,1	159,0	47,2	29,7	87,3	54,8
16	5,00	4,8	159,0	39,7	25,0	94,8	59,6
18	4,98	1,2		0	0	147,1	92,5

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,98-5,50
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,7 g (5,7 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	6,5 g (21,7 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	1,2 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	159,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	147,1 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	147,1 mg/l
Wiederfindungsrate	92,5 %
Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455%	Hydrox. 47%

Tab. 7 Zellstamm 10/56 Anth.4 D. S-Medium

Testergebnisse der 55. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,10	21,5	106,0	84,0	79,3	21,9	20,7
6	4,90	18,3	106,0	60,8	57,4	28,9	27,2
8	5,00	13,5	146,0	73,8	50,4	63,6	43,5
10	5,10	10,1	186,0	97,8	52,6	75,4	40,6
12	5,20	6,3	239,0	94,3	39,4	113,4	47,4
14	5,30	4,0	239,0	67,1	28,1	152,2	63,6
16	5,30	1,8	239,0	36,5	15,3	184,3	77,1
18	5,26	0		24,1	10,1	201,7	84,4

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,90-5,30
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,8 g (6,0 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	7,0 g (23,3 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	0
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	239,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	201,7 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	225,9 mg/l
Wiederfindungsrate	94,5 %
Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455%	Hydrox. 47%

Tab. 8 Zellstamm 10/56 ST30 D. S-Medium

Testergebnisse der 52. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			47,7				
4	5,40	24,4	95,4	39,8	83,4	7,2	15,0
6	5,50	21,9	95,4	74,6	78,1	15,9	16,7
8	5,60	17,4	121,5	20,3	21,3	63,7	66,8
10	5,40	14,0	161,5	0	0	119,0	97,9
12	5,20	11,8	205,5	0	0	154,0	95,3
14	5,10	9,6	232,0	0	0	182,2	88,9
16	5,20	8,2	258,0	0	0	235,9	91,4
18	5,26	6,3		0	0	242,0	93,1

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,10-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,6 g (5,4 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	6,8 g (22,7 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	6,3 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	258,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	242,0 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	242,0 mg/l
Wiederfindungsrate	93,1 %

Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455% Hydrox. 47%

Tab. 9 Zellstamm 10/56 ST30-Se D. GPLW-Medium

Testergebnisse der 5. Passage in 11 Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,30	20,8	84,4	23,8	56,8	16,1	38,4
6	5,30	15,3	134,4	16,6	19,7	66,9	79,3
8	5,40	12,8	176,8	17,4	12,9	110,6	82,2
10	5,30	22,0	219,1	15,0	8,8	134,4	81,2
12	5,00	9,9	235,8	34,4	15,5	171,2	78,2
14	5,00	9,6	282,8	29,4	12,5	196,2	83,4
16	5,20	8,1	309,3	31,3	11,0	237,2	83,8
18	5,32	4,7		27,9	9,0	258,3	83,5

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,4 g (4,6 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	6,8 g (22,8 g/l)
Glucose-Zugabe	9 g (30,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	17,4 g (58,3 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,4 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	309,3 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	258,3 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	286,2 mg/l
Wiederfindungsrate	92,5 %

Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455% Hydrox. 47%

Tab. 10 Zellstamm 30673-14-7-5 GPLW-Medium

Testergebnisse der 6. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,40	24,3	74,0	22,3	53,2	16,1	38,4
6	5,30	17,1	95,1	35,5	48,1	35,1	47,5
8	5,30	15,1	111,0	40,5	42,6	49,7	52,2
10	5,00	13,5	137,5	28,6	25,8	67,4	60,7
12	4,90	15,2	190,5	29,3	21,3	93,6	68,1
14	5,00	11,9	227,6	16,7	8,7	171,4	89,9
16	4,90	13,1	238,2	31,4	13,2	172,2	72,3
18	4,75	10,5		31,6	13,2	194,3	81,5

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,75-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,6 g (5,4 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	6,4 g (21,3 g/l)
Glucose-Zugabe	9 g (30,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	15,7 g (52,5 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,5 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	238,2 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	194,3 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	225,9 mg/l
Wiederfindungsrate	94,8 %

Tab. 11 Zellstamm 30690-21-10-4 D. GPLW-Medium
Testergebnisse der 6. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			47,8				
4	5,40	24,8	69,0	25,9	54,3	17,1	35,8
6	5,20	20,3	100,8	31,8	46,1	29,1	42,2
8	5,10	16,4	137,9	29,1	28,9	66,7	66,2
10	5,00	13,2	153,8	31,0	22,5	85,2	61,8
12	5,00	12,8	175,00	29,5	19,2	104,3	67,8
14	5,20	10,6	185,6	32,5	18,6	115,3	65,9
16	5,20	8,5	185,6	36,4	19,6	129,7	68,2
18	5,22	5,4		33,6	18,1	131,1	70,6

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,9 g (6,5 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	7,0 g (23,3 g/l)
Glucose-Zugabe	6 g (20 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	14,3 g (47,6 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,1 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	185,6 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	131,1 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	164,7 mg/l
Wiederfindungsrate	88,8 %

Tab. 12 Zellstamm 15-8 D. GPLW-Medium

Testergebnisse der 6. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,30	28,1	81,7	27,3	65,1	11,4	27,1
6	5,50	26,9	105,6	31,2	45,6	33,8	49,4
8	5,40	16,8	132,1	33,1	31,3	56,7	53,7
10	5,20	10,7	145,3	35,2	26,6	82,2	62,2
12	5,10	8,1	161,2	32,7	22,5	96,1	66,1
14	4,90	6,8	171,8	45,9	28,4	104,3	64,7
16	4,90	5,3	171,8	44,4	25,1	108,1	62,9
18	4,79	5,8		40,1	23,3	115,3	67,1

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,79-5,50
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,7 g (5,8 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	6,1 g (20,4 g/l)
Glucose-Zugabe	6 g (20,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	14,2 g (47,2 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,3 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	171,8 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	115,3 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	155,4 mg/l
Wiederfindungsrate	90,4 %

Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,260% Hydox. 42%

2.2 Zusammenstellung der Testergebnisse in 1l Kolben

Tab. 13 Zusammenstellung der Testergebnisse nach 18 Tagen in 1l Kolben

Zellstamm	Medium	Passage u.Testzeit	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
10/45 L	S	60.(6.82)	320,0	27,8	8,6	262,9	82,2
10/45 D	S	60.(6.82)	291,9	0	0	282,2	96,6
10/45 D	S	65.(7.82)	323,0	0	0	319,0	98,1
10/45 D	S	70.(9.82)	413,8	18,5	4,3	401,1	92,8
10/45 D	S	75.(11.82)	821,5	60,4	7,3	719,8	87,6
10/45 D	S	80.(1.83)	577,7	67,6	11,7	495,0	85,6
10/45 D	S	85.(2.83)	461,1	29,8	6,4	412,1	89,3
10/45 D	S	90.(4.83)	455,8	142,5	31,2	307,2	67,4
10/45 D	S	95.(5.83)	304,5	44,2	14,5	244,1	80,1
10/45 D	S	100.(6.83)	190,4	31,3	16,4	139,5	73,3
10/45-Se D	GPLW	20.(7.83)	498,1	54,1	10,9	421,4	84,6
10/45-Se D	oCGPLW	20.(7.83)	477,0	38,4	8,0	406,1	85,1
10/45-Se D	GPLW	25.(9.83)	527,9	33,0	6,3	452,3	85,7
10/45-Se D	oCGPLW	25.(9.83)	512,7	52,4	10,2	425,7	83,0

GPR2 D	oCGPLW	4.(4.83)	470,2	38,4	7,8	431,2	87,7
GPR2 D	GPLW	4.(4.83)	424,0	33,8	7,7	366,9	84,4
GPR2 D	OCGPLW	8.(6.83)	410,7	18,8	4,5	370,6	90,2
GPR2 D	GPLW	8.(6.83)	349,5	8,8	2,5	313,4	89,7
GPR2-Se D	oCGPLW	12.(8.83)	540,6	29,1	5,4	455,5	84,3
10/56-S=50 D	S	55.(5.82)	418,7	94,3	22,5	299,6	71,5
10/56-S-50 L	S	55.(5.82)	324,9	31,4	9,6	242,7	76,7
10/56-S-50-Se D	GPLW	10.(4.83)	423,3	22,2	5,2	390,7	92,3
10/56 ST30 D	S	52.(5.82)	258,0	0	0	242,0	93,1
10/56 ST30-Se D	GPLW	5.(4.83)	309,3	27,9	9,0	258,3	83,5
10/56 Anth.4 D	S	55.(6.82)	239,0	24,1	10,1	201,7	84,4
30673-14-7-5 D	GPLW	6.(4.83)	238,2	31,6	13,2	194,3	81,5
10/56-S-20 D	S	52.(5.82)	280,0	91,0	32,5	162,8	58,2
10/52 D	S	54.(5.82)	240,0	46,3	19,3	154,2	64,2
10/56-S10 D	S	52.(5.82)	190,0	8,7	4,6	152,9	80,5
10/56-S-70 D	S	53.(5.82)	159,0	0	0	147,1	92,5
30690-21-10-4 D	GPLW	6.(4.83)	185,6	33,6	18,1	131,1	70,6
15-8 D	GPLW	6.(4.83)	171,8	40,1	23,3	115,3	67,1

2.3 Diskussion

Die Ergebnisse der Biotransformationsversuche im 1l Kolben zeigten, daß diejenigen Zellstämme, die im 100 ml Kolben eine gute Hydroxylierungskapazität zeigten, eine solche auch bei den Versuchen im 1l Kolben aufweisen. Zunächst waren die Ergebnisse analog. Im Laufe des Versuches sank jedoch die Biotransformationskapazität stark ab.

So zeigten bei den Versuchen im 100 ml Kolben die Zellstämme 10/56 Anth. 4 D und 30690 - 21 - 10 - 4 D die besten Hydroxylierungseigenschaften (siehe Tabelle 2). Bereits 4 Tage nach Zugabe von MDt konnte im Medium kein MDt mehr gemessen werden. Es wurde bereits die gesamte Menge biotransformiert. Zellstamm 10/45 zeigte am 4. Tag nach MDt Zugabe noch einen Restgehalt von 5,4 mg/l MDt im Medium. Erst am 6. Tag nach MDt Zugabe konnte nachgewiesen werden, daß sich im Medium kein MDt mehr befand sondern alles zu MDg umgesetzt wurde.

Im 1l Kolben Versuch zeigte sich jedoch, daß der Zellstamm 10/45 D nach der 75. Passage von insgesamt 821,5 mg/l zugegebenem MDt innerhalb von 18 Tagen 719,8 mg zu MDg biotransformierte. Ein Ergebnis welches von keinem anderen Zellstamm erreicht wurde.

Dieser Stamm zeigte über die gesamte Versuchsdauer eine hohe Transformationsaktivität während diese bei den anderen beiden Zellstämmen weniger hoch war. (siehe Tabelle 7,11

und 13). Um zu klären, ob ein Zellstamm hohe oder geringe Hydroxylierungskapazität im Langzeitversuch zeigt, kann ein Versuch im 100 ml Kolben nur als erste Orientierungshilfe dienen. Dieses Ergebnis muß in jedem Falle im 1l Kolben nachgeprüft, schließlich im 20 l Fermenter bestätigt werden.

Untersucht man den Einfluß von Licht für die Zellkulturen so kann man zusammenfassend feststellen daß man bei den Vorversuchen im 100 ml Kolben vereinzelt Kulturen findet, die im Licht bessere Hydroxylierungsraten zeigten als im Dunkeln. Im 1l Kolben Versuch findet man fast ausschließlich bessere Ergebnisse für Dunkelkulturen.

Für Zellkulturen von Digitalis lanata jedoch läßt sich sagen, daß Zellstämme, die von derselben Stammpflanze angelegt wurden, auf denselben Nährmedien als Dunkelkulturen eine wesentlich höhere Transformationsaktivität aufweisen als als Lichtkulturen.

Vergleicht man Tabelle 2 und 13 so findet man bei den Versuchen im 100 ml Kolben vereinzelt Kulturen, die in Licht eine höhere Transformationsaktivität aufweisen. Kultur 10/56-S-50 z.B. weist jedoch beim Biotransformationsversuch im 1l Kolben als Dunkelkultur eine höhere Hydroxylierungskapazität auf.

Dieses Ergebnis ist nun für eine industrielle Nutzung von Digitalis Zellkulturen als günstig anzusehen da die dort verwendeten Fermenter praktisch nicht mit einer Lichtquelle ausgestattet werden können.

3. Versuch zur Ausbeutesteigerung

Um die 12 β Hydroxylierung industriell nutzen zu können soll in folgenden Versuchen die Ausbeute an Methyldigoxin erhöht werden.

3.1 Zellstamm 10/45

3.1.1 Versuche im 1l Kolben

Obiger Zellstamm zeigte in Vorversuchen gute Hydroxylierungskapazität und ist aus diesem Grunde als Hochleistungszellstamm anzusehen.

Um herauszufinden, in wieweit die Umsatzrate von der Anzahl der Passagen abhängig ist wurde obiger Zellstamm lange Zeit beobachtet. Von der 60. bis zur 100. Passage wurden jeweils von Zellstamm 10/45 nach jeder 5. Passage Biotransformationsversuche im 1l Kolben durchgeführt wie die folgenden Tabellen zeigen. Aus den Tabellen 14-23 sind die gemessenen Werte zu entnehmen und in Abbildung 22 wurden die Endergebnisse im Schaubild zusammenfassend dargestellt.

Tab. 14 Zellstamm 10/45 L. S-Medium

Testergebnisse der 60. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			40,0				
4	5,30	25,6	80,0	0	0	35,9	89,0
6	5,40	23,5	120,0	0	0	63,7	79,6
8	5,30	20,1	160,0	0	0	124,0	103,0
10	5,20	19,7	200,0	0	0	158,2	98,9
12	5,00	16,9	240,0	0	0	179,3	89,7
14	4,80	14,1	280,0	0	0	193,0	80,0
16	4,90	13,0	320,0	45,2	16,1	218,0	78,0
18	4,90	12,7		27,8	8,6	262,9	82,2

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,90-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,9 g (6,3 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	7,9 g (26,4 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	12,7 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	320,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	262,9 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	290,7 mg/l
Wiederfindungsrate	90,8 %

Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455% Hydrox. 18%

Tab. 15 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 60. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,4				
4	5,00	23,7	95,4	30,5	71,9	7,5	17,0
6	5,20	25,7	95,4	65,2	68,3	21,1	19,0
8	5,20	22,9	137,8	33,6	35,2	41,6	43,6
10	5,40	19,8	153,7	59,4	43,1	65,7	47,7
12	5,10	17,3	211,9	30,9	20,1	96,6	56,4
14	5,10	15,1	251,9	66,8	31,5	145,2	68,5
16	5,00	12,8	291,9	22,4	8,8	223,3	88,6
18	5,00	9,3		0	0	282,2	96,6

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,0 g (6,7 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	7,1 g (23,6 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	9,3 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	291,9 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	282,2 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	282,2 mg/l
Wiederfindungsrate	96,6 %

Tab. 16 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 65. Passage in 11 Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			37,1				
4	5,00	25,9	79,5	26,3	71,6	2,6	7,1
6	4,90	24,2	100,7	60,2	75,7	17,0	21,4
8	5,20	21,5	143,1	41,2	40,9	43,7	43,4
10	5,30	20,9	159,0	72,1	50,7	61,8	43,2
12	5,20	18,2	190,8	50,5	31,8	88,7	55,9
14	5,10	16,0	217,3	69,3	36,3	116,7	61,2
16	5,00	14,7	323,0	0	0	214,0	98,4
18	5,00	12,9		0	0	319,0	98,1

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,90-5,30
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,8 g (6,2 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	7,8 g (26,1 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	12,9 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	323,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	319,0 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	319,0 mg/l
Wiederfindungsrate	98,1 %

Tab. 17 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 70. Passage in 11 Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,10	27,0	106,0	48,0	45,3	45,6	43,0
6	5,20	26,0	148,0	52,9	36,2	68,9	47,2
8	4,90	22,9	216,0	51,5	24,1	136,7	63,9
10	4,90	21,7	254,0	58,7	22,9	192,3	75,1
12	4,80	18,1	400,0	121,8	30,4	277,3	69,3
14	4,90	14,6	400,0	60,8	15,2	313,3	78,3
16	5,10	12,7	431,8	28,9	7,2	355,3	88,8
18	5,05	10,8		18,5	4,3	401,1	92,8

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,80-5,20
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,0 g (6,6 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,2 g (27,2 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	10,8 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	431,8 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	401,1 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt, ß-MDg	419,6 mg/l
Wiederfindungsrate	97,1 %

Tab. 18 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 75. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,10	22,3	238,5	2,1	3,9	35,2	66,4
6	5,00	18,0	450,5	41,8	17,5	187,3	78,5
8	5,20	15,7	535,3	65,9	14,6	357,8	79,4
10	5,30	13,9	620,1	61,8	11,5	462,8	86,4
12	5,50	12,5	689,0	45,7	7,3	572,7	92,3
14	5,30	9,1	768,5	42,0	6,1	630,6	91,5
16	5,10	9,0	821,5	46,1	6,0	682,3	88,7
18	5,05	7,9		60,4	7,3	719,8	87,6

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,50
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,1 g (6,9 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,5 g (28,2 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	7,9 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	821,5 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	719,8 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	780,2 mg/l
Wiederfindungsrate	94,9 %

Tab. 19 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 80. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			106,0				
4	5,00	26,5	185,5	44,6	42,1	46,6	43,9
6	5,00	25,1	212,0	41,2	22,2	133,7	72,1
8	5,30	23,9	265,0	4,6	2,1	172,1	81,1
10	5,30	21,7	408,1	2,2	0,8	238,6	90,0
12	5,40	18,1	471,7	50,9	12,4	350,1	85,7
14	5,20	15,6	524,5	28,6	6,0	429,2	91,0
16	5,10	13,7	577,7	45,6	8,7	469,8	89,5
18	5,05	11,8		67,6	11,7	495,0	85,6

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,1 g (6,9 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,4 g (28,1 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	11,8 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	577,7 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	495,0 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	562,6 mg/l
Wiederfindungsrate	97,3 %

Tab. 20 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 85. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			122,0				
4	5,10	25,9	212,0	27,5	22,2	81,9	67,1
6	5,20	23,4	222,6	70,6	33,3	137,1	64,9
8	5,30	19,3	265,0	25,9	11,6	186,4	83,7
10	5,40	16,8	299,4	28,7	10,5	226,3	85,4
12	5,20	13,7	360,4	18,9	6,3	261,2	87,2
14	5,10	11,8	413,4	25,5	7,4	303,6	54,2
16	5,00	11,0	461,1	24,0	5,8	370,4	89,6
18	4,98	7,9		29,8	6,4	412,1	89,3

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,98-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,9 g (6,3 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,0 g (26,7 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	7,9 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	461,1 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	412,1 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	441,9 mg/l
Wiederfindungsrate	95,8 %

Tab. 21 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 90. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			84,8				
4	5,10	26,3	111,3	9,3	11,0	60,1	70,8
6	5,00	24,1	137,8	29,6	26,6	67,5	60,6
8	5,20	21,8	270,3	19,7	14,3	100,4	72,8
10	5,40	17,9	296,8	90,4	33,6	157,9	58,4
12	5,20	15,0	402,8	110,0	34,0	167,2	51,7
14	5,20	12,9	429,3	108,1	26,8	269,4	66,8
16	5,00	10,8	455,8	128,6	29,9	292,1	68,0
18	5,00	9,1		142,5	31,2	307,2	67,4

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,0 g (6,6 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,1 g (26,9 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	9,1 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	455,8 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	307,2 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	449,7 mg/l
Wiederfindungsrate	98,6 %

Tab. 22 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 95. Passage in 11 Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			45,0				
4	5,20	27,1	90,0	37,3	74,9	9,4	20,8
6	5,40	24,9	139,0	22,4	24,8	65,0	72,2
8	5,50	22,1	149,6	33,5	24,1	78,4	56,4
10	5,30	19,2	198,5	59,7	39,9	81,5	54,4
12	5,10	15,8	198,5	56,3	33,4	128,4	64,6
14	5,10	14,1	251,5	4,0	2,0	166,4	83,8
16	5,00	11,5	304,5	33,8	13,4	193,0	76,7
18	5,00	8,9		44,2	14,5	244,1	80,1

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,50
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,0 g (6,6 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,1 g (27,1 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	8,9 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	304,5 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	244,1 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	288,3 mg/l
Wiederfindungsrate	94,6 %

Tab. 23 Zellstamm 10/45 D. S-Medium

Testergebnisse der 100. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,10	25,9	68,5	28,2	67,2	11,5	27,3
6	5,20	23,6	95,0	35,5	51,8	28,5	41,7
8	5,10	18,7	126,8	33,0	34,7	52,3	55,1
10	5,40	16,3	142,7	28,9	22,7	75,4	59,5
12	5,20	14,9	158,6	25,3	17,7	89,6	62,9
14	5,10	11,2	190,4	24,8	15,6	113,4	71,5
16	5,00	9,1	190,4	35,7	18,7	137,4	72,2
18	4,96	6,3		31,3	16,4	139,5	73,3

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,96-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,0 g (6,7 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,3 g (27,5 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	6,3 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	190,4 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	139,5 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	173,2 mg/l
Wiederfindungsrate	91,7 %

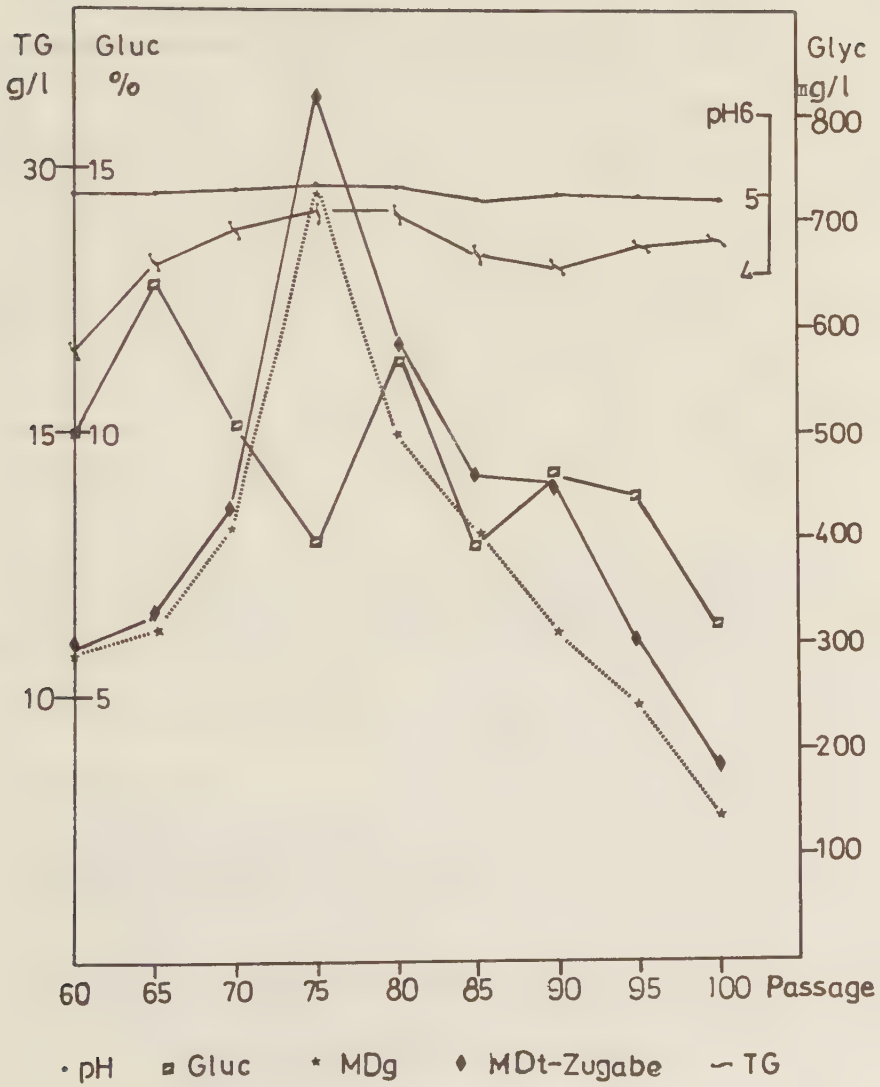


Abb. 22 Hydroxylierung des Dunkelstammes 10/45 nach 18 Tagen (Vergleich: Tabelle 15-23)

3.1.2 Selektionsversuche

Aus Tabelle 14 - 23 sowie Abbildung 22 sieht man, daß der Zellstamm 10/45 am Anfang des Versuches eine relativ kleine Biotransformationskapazität aufweist. In der 60. Passage bildete die Kultur nur noch 282,2 mg/l (= 96%) ß-MDg in 18 Versuchstagen.

Die Hydroxylierungskapazität desselben Stammes stieg im Laufe der Zeit erheblich. So konnte in der 75. Passage ein Spitzenergebnis von 719,8 mg/l MDg gemessen werden. Anschließend sank jedoch die Hydroxylierungskapazität wieder rasch ab und zeigte in der 100. Passage ein Minimum. Von 190,4 mg/l zugegebenem ß-MDt wurden innerhalb 18 Tagen nur 139,5 mg/l umgesetzt. (siehe Abbildung 22)

Von großem Interesse wäre es, die hohe Hydroxylierungskapazität durch geeignete Stammhaltung möglichst aufrecht zu erhalten.

Im folgenden wurde nun versucht,dieses Ziel durch geeignete Selektion von Zellklonen zu erreichen. Zellstämme, die wie im vorab beschriebenen Versuch 18 Tage lang mit ß-MDt gefüttert wurden, waren nach Versuchsende meist braun gefärbt. Aus diesem braunen Zellmaterial mit rötlichem Überstand wurden vereinzelte, helle Zellkonglomerate entnommen und in frisches Nährmedium überführt.

Aus Zellstamm 10/45 D wurde nach dem Biotransformationsversuch im 1l Kolben in der 80. Passage Zellstamm 10/45 -Se D selektioniert. Dieser selektionierte Stamm mußte zunächst 20 Passagen durchlaufen, bevor ausreichend Zellmaterial zur Verfügung stand. Obiger Stamm wurde nach der 20. und 25. Passage als Dunkelkultur auf Medien mit Casein und ohne Casein getestet. Auf beiden Medien zeigte der Stamm die gleiche Biotransformationsaktivität. (Tabellen 24 -27)

Tab. 24 Zellstamm 10/45-Se D. oCGPLW-Medium

Testergebnisse der 20. Passage in 11 Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,30	13,2	180,2	15,0	35,4	20,7	48,8
6	5,50	12,4	201,4	38,1	21,1	123,7	68,6
8	5,40	10,8	259,7	2,1	1,0	181,2	90,1
10	5,50	18,1	339,2	0	0	230,9	88,9
12	5,60	11,6	413,4	0	0	337,4	99,4
14	5,40	13,2	439,9	10,6	2,5	383,2	92,6
16	5,40	13,4	477,0	19,2	4,4	388,7	88,4
18	5,35	8,7		38,4	8,0	406,1	85,1

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,30-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,7 g (5,8 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	5,2 g (17,3 g/l)
Glucose-Zugabe	9 g (30,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	16,3 g (54,3 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	3,1 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	477,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	406,1 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	444,5 mg/l
Wiederfindungsrate	93,1 %

Tab. 25 Zellstamm 10/45-Se D. GPLW-Medium

Testergebnisse der 20. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,40	15,2	74,2	22,0	51,9	15,4	36,3
6	5,30	10,1	159,0	23,4	31,5	46,3	62,4
8	5,40	8,0	227,9	2,5	1,6	149,0	93,4
10	5,50	15,5	302,1	0,7	0,3	214,3	94,0
12	5,60	12,2	434,5	1,2	0,4	281,3	93,1
14	5,50	12,9	455,7	22,9	5,3	390,7	89,9
16	5,50	13,1	498,1	33,7	7,3	412,5	90,5
18	5,45	7,1		54,1	10,9	421,4	84,6

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,30-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,7g (5,8 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	5,4 g (18,0 g/l)
Glucose-Zugabe	9 g (30,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	16,8 g (55,9 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	3,1 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	498,1 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	421,4 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	475,5 mg/l
Wiederfindungsrate	95,4 %

Tab. 26 Zellstamm 10/45-Se D. oCGPLW-Medium

Testergebnisse der 25. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,50	11,2	160,0	1,5	2,8	41,8	78,9
6	5,50	6,6	225,5	10,8	6,7	132,4	82,8
8	5,50	3,8	267,9	7,1	3,1	198,4	88,0
10	5,60	10,2	347,4	7,4	2,7	244,2	91,1
12	5,40	10,5	428,1	0	0	325,9	93,8
14	5,40	9,3	507,6	20,9	4,8	385,0	90,0
16	5,40	7,0	512,7	49,3	9,7	421,1	83,0
18	5,37	6,3		52,4	10,2	425,7	83,0

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,37-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,8 g (6,0 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	5,9 g (19,6 g/l)
Glucose-Zugabe	9 g (30,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	17,0 g (56,7 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,9 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	512,7 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	425,7 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	478,1 mg/l
Wiederfindungsrate	93,2 %

Tab. 27 Zellstamm 10/45-Se D. GPLW-Medium

Testergebnisse der 25. Passage in 11 Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,50	16,5	180,0	5,0	7,4	44,4	84,0
6	5,60	10,0	260,0	8,2	4,5	160,9	89,4
8	5,40	5,9	320,0	13,6	5,2	227,8	87,6
10	5,50	10,8	418,5	22,2	6,9	273,8	85,6
12	5,30	9,9	446,5	11,0	2,6	375,7	89,7
14	5,30	8,7	502,0	35,0	7,8	390,9	87,5
16	5,20	6,2	527,9	34,5	6,9	437,3	87,1
18	4,95	5,6		33,0	6,3	452,3	85,7

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	4,95-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,8 g (6,0 g/l)
Trockenwicht nach 18 Tagen	5,7 g (19,0 g/l)
Glucose-Zugabe	9 g (30,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	17,2 g (57,4 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	3,0 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	527,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	452,3 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	485,3 mg/l
Wiederfindungsrate	92,0 %

3.1.3 Fermenterversuche

Zellstamm 10/45 wurde schließlich im 20 l Airliftfermenter getestet. Die Fermenterversuche wurden in der 80. Passage (1. 1983),bei einem Arbeitsvolumen von 20 l bei Raumbeleuchtung und im Dunkeln durchgeführt.

In Tabelle 28 sind die Versuchsdaten aus beiden Fermentationen gegenübergestellt. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Fermentationsverläufe.

Tab. 28 Übersicht über die Fermentationsdaten von Stamm 10/45 in der 80. Passage, bei unterschiedlichen Kulturbedingungen

	Dunkelkultur	Lichtkultur
Nährmedium	S-Medium	S-Medium
Fermentationsdauer	24 Tage	24 Tage
pH Verlauf	4,60 - 5,64	4,50 - 5,34
Animpfmenge als TG	1,7 g/l	1,7 g/l
Trockengewicht nach 24 Tagen	40,0 g/l	39,1 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	83,5 g/l	83,0 g/l
Glucoseverbrauch pro g TG	2,08 g Gluc.	2,12 g Gluc.
Durchschnittl. Glucosesp. in d. Nachfütterungsphase	1,6 %	1,4 %
Frischzellvol. n. 24 T.	89,0 %	86,0%
ß-MDt-Zugabemenge bis 19. Inkubationstag	697,5 mg/l	395,9 mg/l
Durchschnittl. Spiegel ß-MDt/Tag in d. Nährlös.	26,8 mg/l	35,7 mg/l
ß-MDt nach 19 Inkubat. T.	51,1 mg/l	25,9 mg/l
ß-MDg nach 19 Inkubat. T.	622,5 mg/l	343,4 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt und ß-MDg	673,5 mg/l	369,3 mg/l
Wiederfindungsrate	96,5%	93,3 %

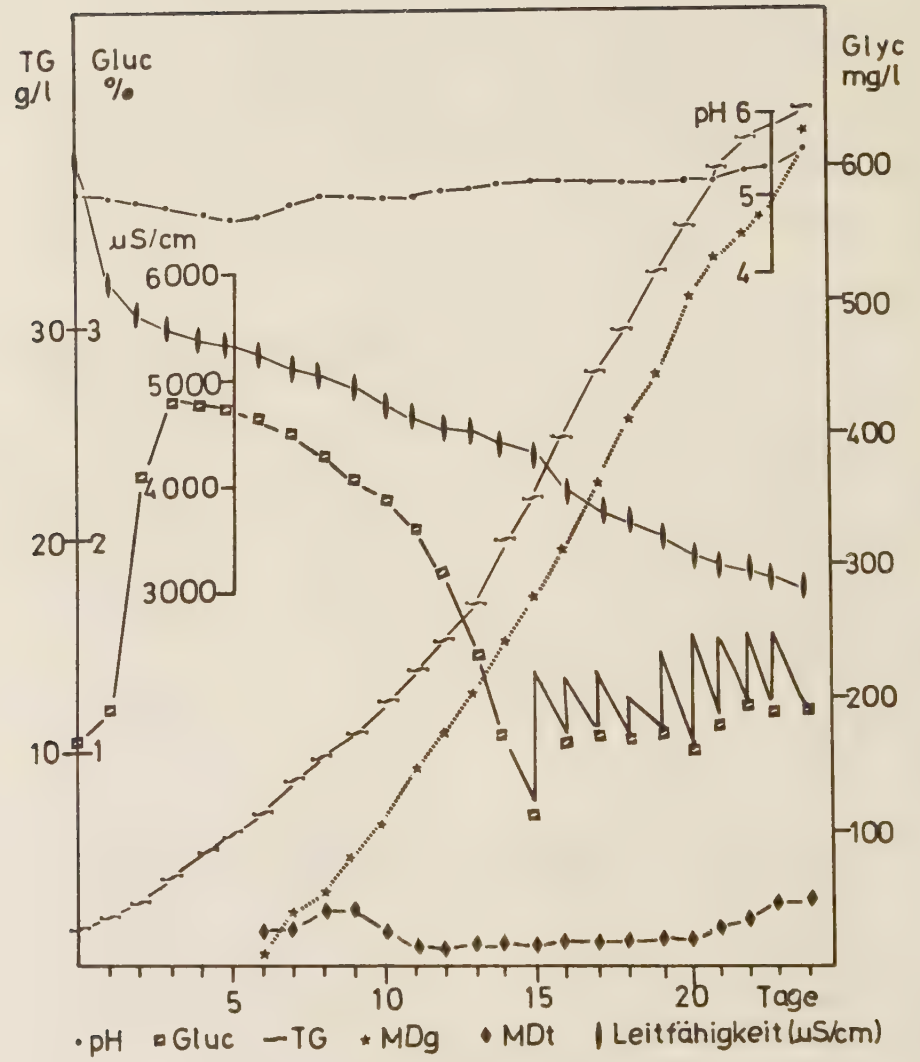


Abb. 23 Fermentation des Dunkelstammes 10/45
24°C, 200-700 NL Luft/h

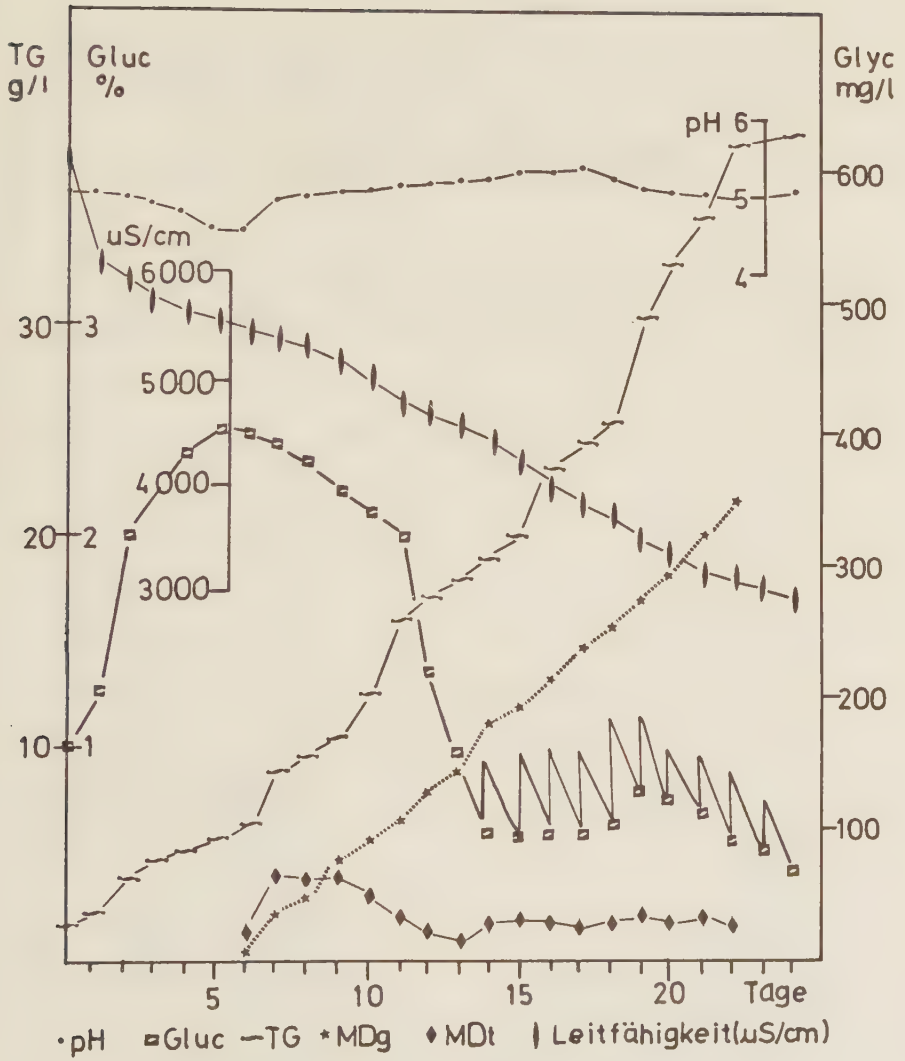


Abb. 24 Fermentation des Lichtstammes 10/45
24°C, 150-680 NL Luft/h

3.2 Zellstamm 10/56-S-50

3.2.1 Versuche in 1l Kolben

Dieser Stamm wurde als Licht und Dunkelkultur untersucht. In Tabelle 29 und 30 sind die Versuchsdaten aufgelistet.

Tab. 29 Zellstamm 10/56-S-50 D. S-Medium
Testergebnisse der 55. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			53,0				
4	5,00	27,5	106,0	61,3	57,9	28,9	27,2
6	5,10	25,4	132,0	69,3	52,5	42,3	32,0
8	5,30	20,1	159,0	60,3	37,9	89,5	56,3
10	5,50	17,4	174,9	32,6	18,6	111,8	63,9
12	5,20	12,3	222,9	29,1	16,6	118,7	68,3
14	5,20	8,3	333,9	20,6	9,0	181,9	79,8
16	5,10	6,1	418,7	84,2	25,2	205,2	61,4
18	5,06	4,2		94,3	22,5	299,6	71,5

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,00-5,50
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,2 g (7,1 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	8,6 g (28,6 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	4,2 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	418,7 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	299,6 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt u. ß-Mdg	394,0 mg/l
Wiederfindungsrate	94,1 %
Ausgangspflanze Dg-gehalt 0,455%	Hydrox. 47%

Tab. 30 Zellstamm 10/56-S-50 L. S-Medium

Testergebnisse der 55. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,20	21,1	89,7	19,2	45,7	22,2	53,0
6	5,40	20,2	158,6	8,1	9,1	76,9	85,7
8	5,40	17,1	190,4	23,3	14,7	133,6	84,2
10	5,30	12,3	234,9	17,3	9,1	158,6	83,3
12	5,20	8,1	272,0	29,9	12,7	198,2	84,3
14	5,10	6,6	309,1	26,4	10,4	219,4	84,6
16	5,20	5,2	324,9	31,3	10,1	240,2	77,7
18	5,40	2,0		31,4	9,6	242,7	74,7

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,10-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	2,0 g (6,9 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	10,4 g (34,6 g/l)
Glucose-Zugabe	0
Restglucose nach 18 Tagen	2,0 g/l
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	324,9 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	242,7 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	274,2 mg/l
Wiederfindungsrate	84,4 %

3.2.2 Selektionsversuch

Zellstamm 10/56-S-50-Se wurde aus der Dunkelkultur des Stammes 10/56-S-50 in der 55. Passage selektioniert. Tabelle 31 zeigt die Versuchsdaten.

Tab. 31 Zellstamm 10/56-S-50-Se D. GPLW-Medium
Testergebnisse der 10. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe	ß-MDt		ß-MDg	
				mg/l	%	mg/l	%
1							
2			42,0				
4	5,40	21,3	89,2	19,1	45,6	21,9	52,2
6	5,30	17,2	152,8	10,1	11,3	76,9	86,3
8	5,30	13,3	205,8	12,3	8,0	134,1	87,7
10	5,30	21,3	269,4	9,5	4,6	183,6	89,2
12	5,20	13,3	344,2	25,5	9,4	238,5	88,5
14	5,10	11,6	391,9	16,6	5,5	277,4	92,7
16	5,10	5,7	423,3	33,0	8,4	355,8	90,7
18	5,22	3,4		22,2	5,2	390,7	92,3

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,10-5,40
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,6 g (5,3 g/l)
Trockengewicht n. 18 Tagen	7,8 g (26,2 g/l)
Glucose-Zugabe	9 g (30,0 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	17,8 g (59,8 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,5 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	423,3 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	390,7 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt u. ß-MDg	412,9 mg/l
Wiederfindungsrate	97,5 %

3.2.3 Fermenterversuche

Die Fermenterversuche wurden mit der Licht und Dunkelkultur des Stammes 10/56-S-50 durchgeführt.
In Tabelle 32 sind die Daten aus beiden Fermentationen gegenübergestellt. Die Abbildungen 25 und 26 zeigen Fermentationsverläufe.

Tab. 32 Übersicht über die Fermentationsdaten von Stamm 10/56-S-50 in der 70. Passage(11.1982), bei unterschiedlichen Kulturbedingungen

	Dunkelkultur	Lichtkultur
Fermentationsdauer	20 Tage	20 Tage
pH Verlauf	4,80-5,25	4,85-5,64
Animpfmenge als TG	1,6 g/l	1,6 g/l
Trockengewicht n. 20 T.	18,1 g/l	17,5 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	48,4 g/l	47,1 g/l
Glucoseverbrauch pro g TG	2,7 g Gluc.	2,7 g Gluc.
Durchschnittl. Glucosesp.	1,7 %	1,7 %
Frischzellvol. n. 20 T.	44,0 %	40,0 %
ß-MDt-Zugabemenge bis 14. Inkubat. T.	412,3 mg/l	318,5 mg/l
Durchschnittl. Spiegel ß-MDt/Tag	34,3 mg/l	36,3 mg/l
ß-MDt nach 14 Inkubat. T.	1,4 mg/l	10,2 mg/l
ß-MDg nach 14 Inkubat. T.	352,8 mg/l	265,6 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt und ß-MDg	354,2 mg/l	257,8 mg/l
Wiederfindungsrate	85,9 %	86,6 %

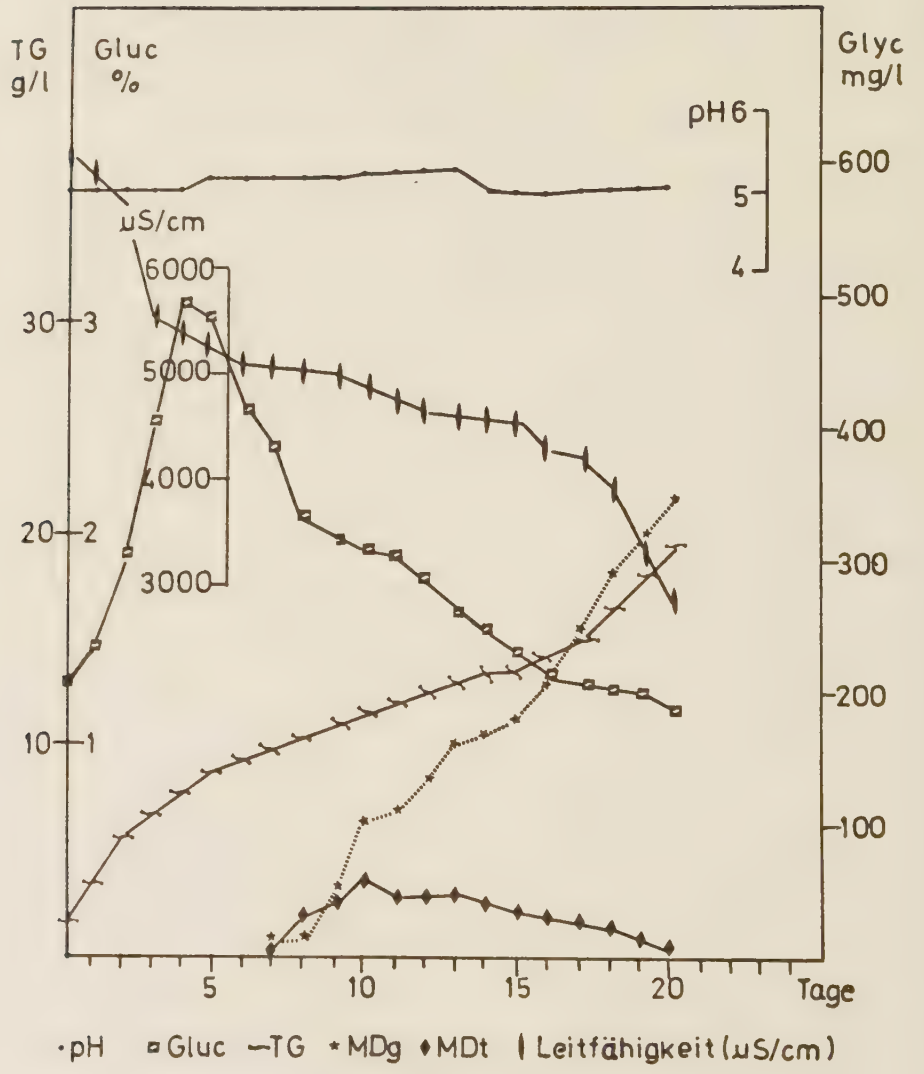


Abb. 25 Fermentation des Dunkelstammes 10/56-S-50
24° C, 150-600 NL Luft/h

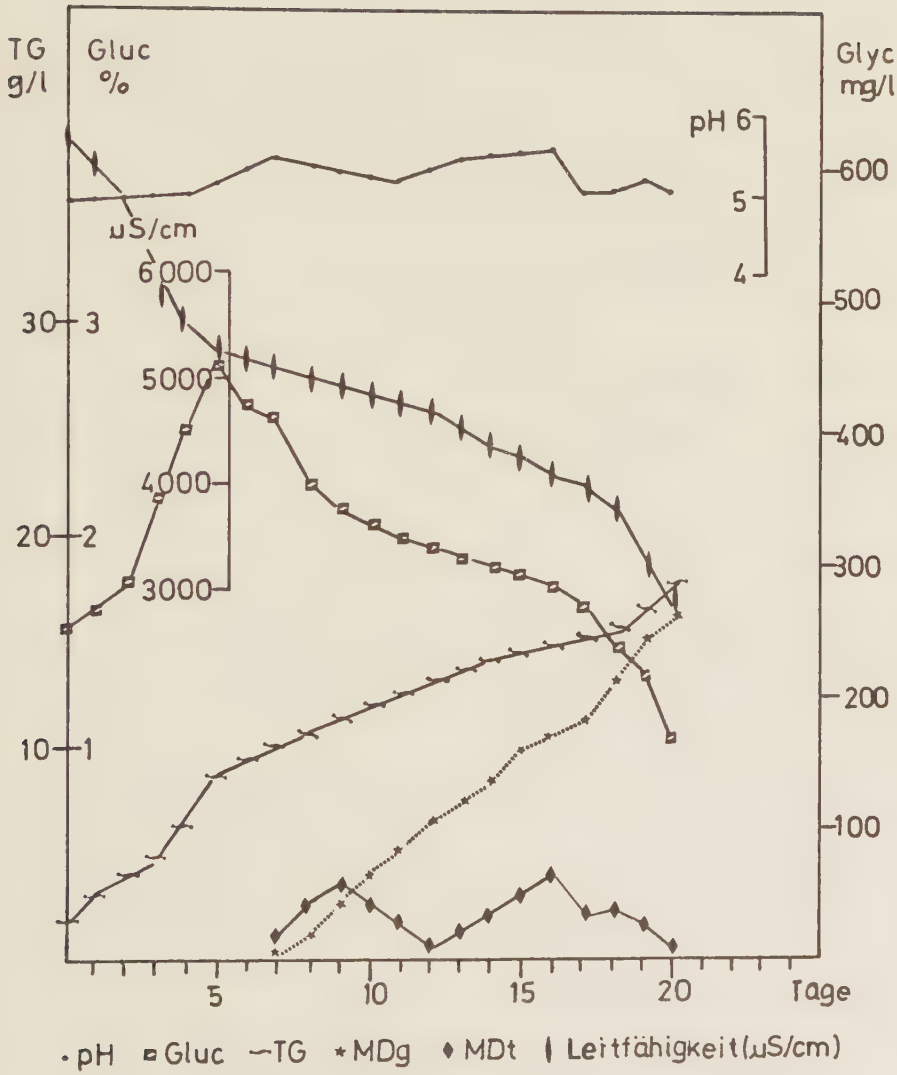


Abb. 26 Fermentation des Lichtstammes 10/56-S-50
24° C, 120-560 NL Luft/h

3.3 Zellstamm GPR2

Dieser Stamm war früher Zellkultur 287-R-121, welche aus Zellstamm 287 selektioniert wurde. Nach der 121. Passage war die Biotransformationsrate in der Suspensionskultur gleich null. Daraufhin wurde Stamm 287-R-121 auf Agarmedium zu Kalluskulturen herangezogen und nach einem Jahr wiederum in Suspension gebracht (Stamm GPR2). Die Biotransformation wurde aktiviert, nahm aber in den folgenden Subkulturen rasch wieder ab. Durch Selektion wurde die Hydroxylierungsaktivität wieder höher (siehe Tab. 33-37).

3.3.1 Versuche in 100 ml Kolben

Getestet wurde der Dunkelstamm in der 3. Passage in oCGPLW-Medium, angeimpft mit 2,0 g (FG) Gewebe (=0,086 g TG). Die Zellaggregate waren 2-4 mm gross und hellgelb gefärbt. Die Zellmasse war auf das 3,5 Fache angewachsen, im Nährmedium wurde noch 10,7 g/l Restglucose gemessen. Die Biotransformationsaktivität dieses Stammes war wieder hoch. Ab Zugabe von der ß-MDt-Lösung wurde nach 3,5 und 7 Versuchstagen 84,0 %, 98,4 % und 89,0 % ß-MDg gemessen. Nach 3 Tagen wurde kein ß-MDt mehr gefunden.

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	TG g/l	E/A	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
3	4,75	17,3	7,8	2,2	0	0	33,6	84,0
5	4,80	16,2	9,3	2,7	0	0	39,4	98,0
7	5,00	10,7	12,3	3,5	0	0	35,6	89,0

3.3.2 Versuche im 1l Kolben

Vorab genannter Stamm wurde als Dunkelkultur während der 4. und 8. Passage in caseinhaltigem und caseinfreiem Nährmedium untersucht. Die Versuchsdaten sind in Tabelle 33,34, 35 und 36 aufgeführt.

Tab. 33 Zellstamm GPR2 oCGPLW-Medium

Testergebnisse der 4. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,40	22,2	112,0	9,7	23,2	31,4	74,7
6	5,30	18,7	138,5	27,7	24,7	83,6	74,7
8	5,20	17,7	191,5	12,9	9,3	121,4	87,6
10	5,30	16,1	255,1	8,3	4,3	168,3	87,9
12	5,20	20,7	311,2	10,1	3,9	231,0	90,5
14	5,40	16,4	427,8	9,5	3,1	289,5	92,0
16	5,50	10,2	470,2	19,7	4,6	398,9	93,2
18	5,60	8,4		38,4	7,8	431,2	87,7

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,20-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	0,7 g (2,3 g/l)
Trockengewicht n. 18 Tagen	8,2 g (27,2 g/l)
Glucose-Zugabe	8 g (26,6 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	15,3 g (51,2 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	1,8 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	470,2 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	431,2 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	469,6 mg/l
Wiederfindungsrate	95,5 %

Tab. 34 Zellstamm GPR2 GPLW-Medium

Testergebnisse der 4. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,0				
4	5,40	21,6	102,0	15,8	37,6	21,4	51,1
6	5,50	16,2	134,0	23,4	23,0	76,6	75,1
8	5,30	14,0	176,4	18,5	13,8	99,1	74,0
10	5,30	26,9	233,6	11,2	6,3	140,6	79,7
12	5,20	15,0	286,6	12,7	5,4	199,7	85,5
14	5,20	12,7	403,2	10,0	3,5	241,1	84,1
16	5,30	5,8	424,0	29,9	7,4	347,9	86,3
18	5,40	5,1		33,8	7,7	366,9	84,4

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,20-5,50
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	0,7 g (2,3 g/l)
Trockengewicht n. 18 Tagen	9,0 g (30,1 g/l)
Glucose-Zugabe	8 g (26,6 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	16,3 g (54,5 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	1,8 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	424,0 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	366,9 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	400,8 mg/l
Wiederfindungsrate	92,2 %

Tab. 35 Zellstamm GPR2 oCGPLW-Medium

Testergebnisse der 8. Passage in 11 Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			47,2				
4	5,50	19,9	89,6	0	0	40,0	84,7
6	5,40	17,8	165,4	3,7	4,1	75,1	83,8
8	5,60	9,2	238,0	6,3	3,8	137,6	83,2
10	5,50	10,4	259,2	17,9	7,5	202,9	85,2
12	5,50	3,5	312,2	13,4	5,2	231,2	89,2
14	5,40	8,1	394,8	14,6	4,7	271,6	87,0
16	5,40	12,7	410,7	18,8	4,5	362,6	91,2
18	5,45	7,2		18,8	4,5	370,6	90,2

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,40-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	0,7 g (2,3 g/l)
Trockengewicht n. 18 Tagen	7,8 g (26,0 g/l)
Glucose-Zugabe	10 g (33,3 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	17,7 g (59,1 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,2 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	410,7 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	370,6 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	389,4 mg/l
Wiederfindungsrate	94,8 %

Tab. 36 Zellstamm GPR2 GPLW-Medium

Testergebnisse der 8. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
2			47,2				
4	5,40	19,9	70,2	17,6	37,3	18,4	39,1
6	5,30	14,2	185,2	21,1	30,1	39,8	56,8
8	5,50	12,0	185,2	50,4	27,2	117,8	63,6
10	5,40	9,9	211,1	40,1	21,6	127,3	68,7
12	5,60	15,4	254,1	30,8	14,6	167,6	79,4
14	5,50	10,2	307,1	27,3	10,7	220,2	86,6
16	5,40	9,4	349,5	37,8	12,3	245,9	80,1
18	5,30	7,0		8,8	2,5	313,4	89,7

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,30-5,60
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	0,7 g (2,3 g/l)
Trockengewicht n. 18 Tagen	8,0 g (27,0 g/l)
Glucose-Zugabe	10 g (33,3 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	17,7 g (59,3 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	2,2 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	349,5 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	313,4 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	322,3 mg/l
Wiederfindungsrate	92,2 %

3.3.3 Selektionsversuch

Zellstamm GPR2-Se wurde aus der Dunkelkultur des Stammes GPR2 in caseinfreiem Medium während der 4. Passage selektioniert. Tabelle 37 zeigt die Versuchsdaten.

Tab. 37 Zellstamm GPR2-Se D. oCGPLW-Medium
Testergebnisse der 15. Passage in 1l Kolben

Zeit Tage	pH	Glucose g/l	ß-MDt-Zugabe	ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
1							
2			42,4				
4	5,50	25,1	84,8	7,6	17,8	22,2	52,4
6	5,30	13,4	148,4	24,7	29,2	45,3	53,5
8	5,20	10,3	217,3	0	0	135,9	91,6
10	5,50	15,3	302,1	1,9	0,8	203,1	93,4
12	5,40	9,9	429,3	8,4	2,7	291,0	96,3
14	5,50	16,9	471,7	6,1	1,4	402,5	93,7
16	5,30	16,2	540,6	19,6	4,2	412,9	88,4
18	5,55	7,1		29,1	5,4	455,5	84,3

Kulturdauer	18 Tage
pH Verlauf	5,20-5,55
Animpfmenge als FG	20 g (66,7 g/l)
Animpfmenge als TG	1,2 g (4,0 g/l)
Trockengewicht nach 18 Tagen	5,6 g (19,0 g/l)
Glucose-Zugabe	12 g (40 g/l)
Gesamtglucoseverbrauch	19,5 g (65,3 g/l)
Glucoseverbrauch pro g TG	3,4 g Glucose
ß-MDt-Zugabemenge bis 18. Tag	540,6 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen	455,5 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt,ß-MDg	484,7 mg/l
Wiederfindungsrate	89,7 %

3.3.4 Fermenterversuch

Zellstamm GPR2 wurde als Dunkelkultur in oCPLW-Medium auf seine Hydroxylierungskapazität im 20 l Airlift Fermenter getestet.
In Tabelle 38 sind die Daten der Fermentation erfaßt. Abbildung 27 zeigt den Verlauf der Fermentation über die gesamte Dauer von 20 Tagen.

Tab. 38 Übersicht über die Fermentationsdaten von Dunkelstamm GPR2 in der 5. Passage(5.1983), im Vollmedium ohne Casein

Fermentationsdauer	20 Tage
pH Verlauf	5,00-5,90
Animpfmenge als TG	0,9 g/l
Trockengewicht n. 20 T.	35,8 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	77,0 g/l
Glucoseverbrauch pro g TG	2,15 g Glucose
Durchschnittl. Glucosesp. in d. Nachfütterungsphase	1,49 %
Frischzellvol. n. 20 Tagen	
ß-MDt-Zugabemenge bis 15. Inkubationstag	745,9 mg/l
Durchschnittl. Spiegel ß-MDt/Tag in d. Nährlösung	16,8 mg/l
ß-MDt nach 15 Inkubat. T.	47,6 mg/l
ß-MDg nach 15 Inkubat. T.	660,6 mg/l
Gesamtwiederfindung an ß-MDt und ß-MDg	708,2 mg/l
Wiederfindungsrate	94,9 %

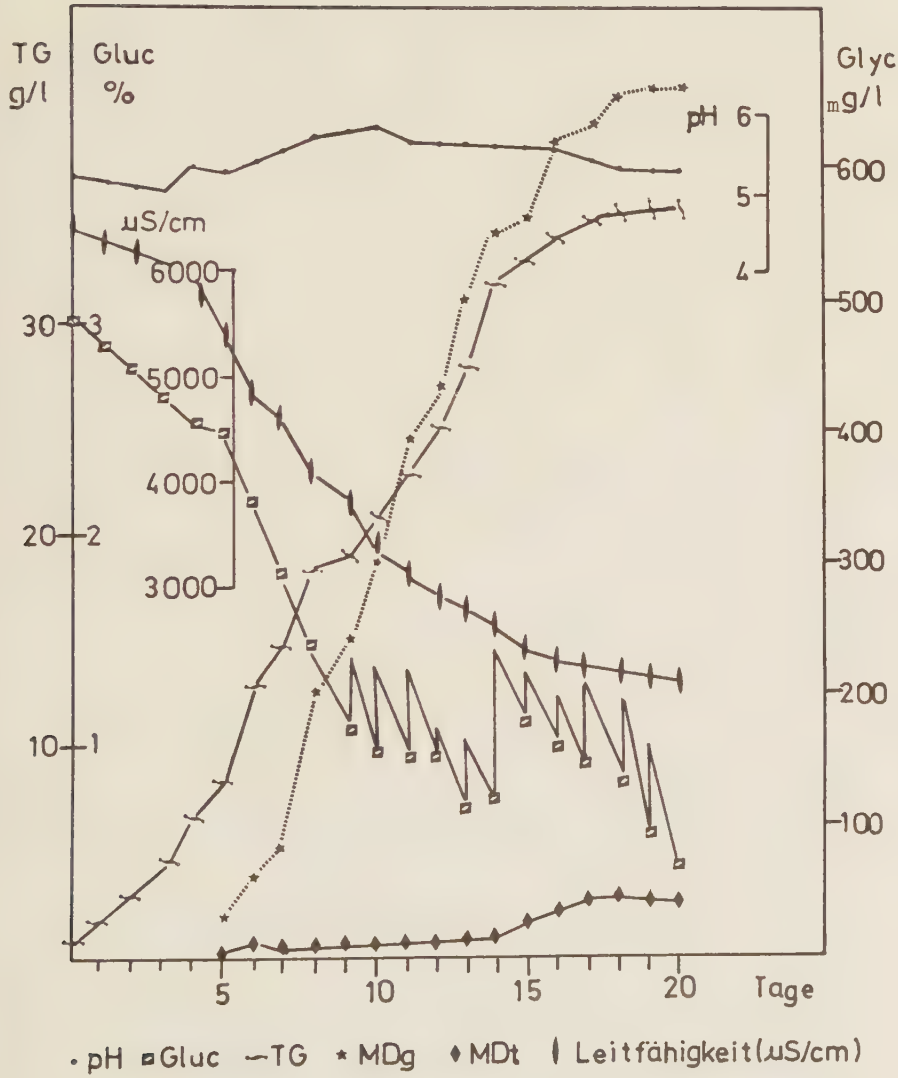


Abb. 27 Fermentation des Dunkelstamm GPR2 im oCGPLW-Medium, 24°C, 120-600 NL Luft/h

3.4 Zusammenstellung der Fermentationsergebnisse

Tab. 39 Zusammenstellung der Fermentationsergebnisse am Ende der Inkubation

Zellstamm	Passage	Medium	Fermentations -dauer Tage	ß-MDt-Zugabe mg/l	Nährlösung ß-MDt mg/l	ß-MDt %	ß-MDg mg/l	ß-MDg %
10/45 L.	80.	S	24	395,9	25,9	6,6	343,4	86,7
10/45 D.	80.	S	24	697,5	51,1	7,3	622,5	89,2
10/56-S-50 L.	70.	S	20	318,5	10,2	3,2	265,6	83,4
10/56-S-50 D.	70.	S	20	412,3	1,4	0,3	352,8	85,6
GPR2 D.	5.	oCGPLW	20	745,9	47,6	6,3	660,6	88,6

3.5 Diskussion

Am Ende dieser Arbeit sollten einige Zellstämme, die im 1l Kolben gute Ergebnisse zeigten, ihre hohe Hydroxylierungskapazität im Fermenter unter Beweis stellen. Außerdem sollte versucht werden , eine möglichst hohe Hydroxylierungsrate zu erreichen.

Vergleicht man die im Folgenden dargestellten Ergebnisse der Dunkel und Lichtkulturen,so stellt man fest, daß die ermittelte Menge an ß-MDg zu Versuchsende bei den Dunkelkulturen immer höher war als bei den Lichtkulturen. Es wurde mehr MDt transformiert.

Eine Vielzahl von Versuchen beweist dies. So wurden von der Dunkelkultur des Stammes 10/45 in der 80. Passage von 697,5 mg/l zugesetztem ß-MDt 622,5 mg/l zu ß-MDg transformiert, während die Lichtkultur nur ein Ergebnis von 343,4 mg/l zeigte. Auch Zellstamm 10/56 -S- 50 zeigte als Dunkelkultur bessere Ergebnisse als die entsprechende Lichtkultur.

Außer der Lichteinwirkung ist die Zusammensetzung des Nährmediums für die Hydroxylierungsaktivität von Bedeutung.

Verwendet werden S- Medium, GPLW - und OCGPLW - Medium. Vergleicht man die Hydroxylierungsraten des gleichen Zellstammes in GPLW und OCGPLW - Medium bei sonst unveränderten Versuchsbedingungen so stellt man fest, daß der Zellstamm 10/45-Se D auf beiden Medien gleiche Mengen MDg produziert.

Zellstamm GPR2 zeigt jedoch im Medium ohne Casein bessere Biotransformationsraten als in dem selben mit Casein. (siehe Tabelle 13) Das heißt, es muß bei jedem einzelnen Zellstamm gesondert getestet werden, ob ein Zusatz von Casein die Hydroxylierung positiv oder negativ beeinflußt.

Zellstamm	Passage	Medium	MDg n. 18 T. mg/l
10/45-Se D.	20.	GPLW(mit Casein)	421,4
10/45-Se D.	20.	oCGPLW(ohne Casein)	406,1
10/45-Se D.	25.	GPLW(mit Casein)	452,3
10/45-Se D.	25.	oCGPLW(ohne Casein)	425,7
GPR2 D.	4.	GPLW(mit Casein)	366,9
GPR2 D.	4.	oCGPLW(ohne Casein)	431,2
GPR2 D.	8.	GPLW(mit Casein)	313,4
GPR2 D.	8.	oCGPLW(ohne Casein)	370,6

Ein zweites Ziel wäre es, eine bei einem bestimmten Zellstamm erreichte hohe Hydroxylierungskapazität durch geeignete Stammhaltung aufrecht zu erhalten.

Zum einen besteht die Möglichkeit aus bereits degenerierten Zellen am Ende eines Versuchs einzelne helle Zellkonglomerate in Suspension zu nehmen und zu vermehren. Zum andern besteht die Möglichkeit die hellen Zellkonglomerate auf Agar zu vermehren und nach längerer Zeit wieder in Suspension zu nehmen. Zellstamm 10/45 wurde bereits von Baumann (1980) getestet. Dieser stellte nach der 14. Passage

im 100ml Erlenmeyerkolben keine Biotransformationsaktivität fest. Mit dem selben Stamm wurde in der 75. Passage mit 719,8 mg/l MDg ein sehr gutes Ergebnis erzielt. Die Hydroxylierungsaktivität sank in den folgenden Passagen rasch ab. (100. Passage nur noch 139,5 mg/l) Jedoch konnte durch Selektion während der 80. Passage ein neuer Zellstamm in Suspension gezüchtet werden, der eine nach 20 Passagen mit 421 mg/l MDg höhere Biotransformationsrate zeigte als der Ausgangsstamm in der 80. Passage. Nicht immer kann durch Selektion die Hydroxylierungskapazität erhöht werden, wie Stamm 10/56 ST 30-Se beweist. (Vergl. auch Tabelle 13)

Zellstamm GPR 2 stammte ursprünglich von Zellkultur 287-R-121. Die Biotransformationsaktivität von Zellkultur 287-R-121 war ursprünglich gleich null. Daraufhin wurde Stamm 287-R-121 auf Agar zu Kalluskulturen herangezogen und nach 1 Jahr wieder in Suspension gebracht. So konnte die Biotransformationsaktivität des ursprünglichen Zellstammes 287-R-121 reaktiviert werden.

Eine allgemeingültige Aussage, für welche Zellstämme die Selektion in Suspension besser ist, und welche zunächst auf Agar herangezogen werden sollten um erst später in Suspension genommen zu werden, läßt sich aus vorliegenden Versuchen nicht ableiten.

D Zusammenfassung

Kalluskulturen Digoxinreicher Pflanzen von Digitalis lanata ssp. lanata und ssp. leucophaea wurden angelegt. Zur Untersuchung des Biotransformationsverhaltens wurden die Kalli in Suspension kultiviert. Von 47 verschiedenen Pflanzen wurden über 80 Zellkulturen angelegt, mit welchen Hydroxylierungsversuche durchgeführt wurden. Die Ausgangspflanze wurde anhand ihres Digoxingehaltes ausgewählt. Der Hydroxylierungstest an der Pflanze wurde mit ß-Methyldigitoxin als Substrat durchgeführt.

Es ergab sich für diese 47 Pflanzen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Digoxinproduktion der Ausgangspflanze und der ermittelten Hydroxylierungskapazität in der Pflanze. Darüber hinaus zeigten die aus gut hydroxylierenden Pflanzen angelegten Zellkulturen nicht in allen Fällen auch eine hohe Hydroxylierungskapazität.

Um zu klären in welchem Pflanzenorgan die Biotransformationsaktivität am größten ist wurden Zellkulturen aus Blattrosette, Blütenstengel, Antheren und Seitentrieben ange-

legt. Nach zahlreichen Versuchen zeigten sich verschiedene Ergebnisse. Zellstamm 10/45 entstammt beispielsweise der Blattrosette und zeigte Spitzenergebnisse. Bei Pflanze 10/56 zeigte der Zellstamm, welcher aus der Blattrosette angelegt wurde, geringere Hydroxylierungsaktivität im Vergleich zum entsprechenden Zellstamm welcher aus den Seitentrieben angelegt wurde. Eine allgemeingültige Aussage läßt sich somit aus den vorliegenden Versuchsergebnissen nicht ableiten.

Zellstämme, welche beim Screeningversuch eine Umsatzrate von mehr als 50% an zugesetztem MDt zeigten, wurden im Langzeitversuch getestet. Es wurde versucht, im Literkolben einen MDt Spiegel von 40 mg/l aufrecht zu erhalten. Nach 18 Versuchstagen wurde die Gesamtmenge an MDg gemessen. Senkt man den ß-MDt Spiegel, so wird entsprechend weniger an MDt umgesetzt. Andererseits wird die Zellschädigung um so größer, je höher die Konzentration des Substrates -also an MDt- ist. Zellen mit hoher Umsatzrate ist eine kurzzeitig hohe Substratkonzentration eher zuzumuten als solchen mit geringer Umsatzrate, da bei solchen mit hoher Transformationskapazität die Konzentration des Substrates auch schneller sinkt.

Untersucht man den Einfluß von Licht und Dunkelheit auf die Hydroxylierungsaktivität, wie dies in vorliegender Arbeit oftmals durchgeführt wurde, so wird man feststellen, daß man bei den Vorversuchen im 100 ml Kolben vereinzelt Kulturen findet, die im Licht bessere Aktivität zeigen als

im Dunkeln. Der 1l Kolbenversuch und die Fermentationen zeigen fast ausnahmslos bessere Ergebnisse für Dunkelkulturen. Dieses Ergebnis kommt der industriellen Nutzung des Verfahrens entgegen, weil die von der Industrie verwendeten Fermenter ohnehin meistens nur mit großem Aufwand mit einer Lichtquelle ausgestattet werden könnten.

Vergleicht man die Hydroxylierungsraten verschiedener Zellkulturen in verschiedenen Medien bei sonst unveränderten Versuchsbedingungen so wird man feststellen, daß manche Kulturen in solchen Medien mit Casein andere wiederum in Solchen ohne Casein bessere Ergebnisse zeigen. Um eine möglichst hohe Transformationsrate von MDt zu MDg zu erreichen erscheint es nötig, für jeden Zellstamm in einer Vielzahl von Versuchen das optimale Medium herauszufinden.

Zu Beginn der Arbeit wurde mit bidestilliertem Wasser gearbeitet. Später wurden Versuche mit Leitungswasser eingeflochten. Dabei zeigte sich, daß auch eine Kultivierung auf Leitungswasser anstatt bidestilliertem Wasser ohne Verlust der Hydroxylierungsaktivität möglich ist.

Bei den Versuchen mit dem Zellstamm 10/45 wurde in der 75. Passage ein Spitzenergebnis von 710 mg/l gemessen. Die Umsatzrate sank bis zur 100. Passage auf 136 mg/l MDg ab. Durch Selektion während der 80. Passage konnten mit dem selektionierten Zellstamm nach 20 Passagen etwa gleiche Ergebnisse erzielt werden als während der 80. Passage durch den ursprünglichen Stamm. Zur Zeit der 20. Passage des selektio-

nierten Stammes befindet sich der ursprüngliche Stamm bei weiterer Kultivierung in der 100. Passage. Der selektionierte Stamm zeigt somit im Vergleich zum Ausgangsstamm deutlich bessere Ergebnisse.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die bei einem bestimmten Zellstamm einmal erreichte hohe Aktivität durch geeignete Methoden aufrecht zu erhalten. Zwei Möglichkeiten wurden beschrieben :

Zum einen die Möglichkeit der Selektion, d.h. aus bereits degenerierten Zellen am Ende eines Versuches werden einzelne helle Zellkonglomerate in Suspension genommen und vermehrt. Zum andern die Möglichkeit, vital erscheinende Zellkonglomerate aus der Suspension zunächst auf Agar zu vermehren und anschließend wieder in Suspension zu nehmen. Von dieser Möglichkeit wurde bei Zellstamm GPR2 Gebrauch gemacht.

Welches der oben beschriebenen Verfahren das Mittel der Wahl sein wird um eine hohe Hydroxylierungskapazität durch geeignete Stammhaltung aufrecht zu erhalten, läßt sich nach den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht sagen. Dies muß für jeden Stamm durch Versuche ermittelt werden.

E Literaturverzeichnis

ALFERMANN, A.W., D.MERZ und E. REINHARD: Induktion der Anthocyanbiosynthese in Kalluskulturen von Daucus carota. Planta Med. Suppl. 70 (1975)

ALFERMANN, A.W. und E. REINHARD: Biotransformation by Plant Tissue Cultures. Bulletin de la Société Chimique de France 1-2, 35 (1980)

ALFERMANN, A.W., W. BERGMANN, C. FIGUR, U. HELMBOLD, D. SCHWANTAG, I. SCHULLER and E. REINHARD: Biotransformation of ß-methyldigitoxin to ß-methyldigoxin by cell cultures of Digitalis lanata. in: Plant Biotechnology 1983, S.H. MANTELL and H. SMITH (eds.), Cambridge University Press, 67 (1983)

AMINUDDIN and A.R. CHOWDHURY: Production of Diosgenin in Somotic Callus Tissues of Dioscorea floribunda. Planta Med. 48, 92 (1983)

BAUMERT, A., I.N. KUZOVKINA, M. HIEKE and D. GRÖGER: Biosynthesis of Rutacridone: The N-Methylation Step. Planta Med. 48, 142 (1983)

BARTHLEN, U.: 12β-Hydroxylierung von β-Methyldigitoxin in Fermenter und Suspensionskulturen von Digitalis lanata.Untersuchungen zur Nährmediumsoptimierung. Dissertation Tübingen (1983)

BAUMANN, L.: Biotransformationsversuche mit Digitalis lanata Gewebekulturen.Selektion von 12β-Hydroxylieren den Zellstämmen. Diplomarbeit Tübingen (1980)

BERGMANN, L. und A.L. BERGMANN: Aktivierung der Biosynthese von Thiamin in Calluskulturen von Nicotiana tabacum im Licht. Planta Med. 79,81 (1968)

BUCKLAND, E. and D.M. TOWNSLEY: Coffee cell suspensione cultures. Caffeine and chlorogenic acid content. J. Can. Inst. Food Sci. Technol., 8, 164 (1975)

DÖLLER, G.: Influence of the Medium on the Production of Serpentine by Suspension Cultures of Catharanthus roseus (L.) G. Don. in: A.W.Alfermann and E.Reinhard (eds.), Production of natural compounds by cell culture methods, München 1978, Ges. Strahlen- und Umweltforschung, 109 (1978)

DÖLLER, P.C.: Biotransformation von Cardenoliden.Vergleichende Untersuchungen mit Zellkulturen von Thevetia neriifolia und Digitalis lanata. Dissertation Tübingen (1978)

FRIEDRICHSON, J.G.: Versuche zur Hydroxylierungskapazität von Blättern, Suspensions und Fermentationskulturen Dissertation Tübingen (1979)

FURUYA, T., M. HIROTANI and T. SHINOHARA: Biotransformation of Digitoxin by Suspension Callus Cultures of Digitalis purpurea. Chem. Pharm. Bull., Tokyo 18, 1080 (1970)

FURUYA, T., T. YOSHIKAWA, Y. ORIHARA and H. ODA: Saponin Production in Cell Suspension Cultures of Panax ginseng. Planta Med. 48, 83 (1983)

GARVE, R., M. LUCKNER, E. VOGEL, A. TEWES and L. NOVER: Growth Morphogenesis and Cardenolide Formation in Longterm Cultures of Digitalis lanata. Planta Med. 40, 92 (1980)

HEINS, M.: Screening of Digitalis lanata Plants and Cell Cultures for Hydroxylation Capacity. in: A.W.Alfermann and E. Reinhard (eds.), Production of natural compounds by cell culture methods, München, Ges. Strahlen-und Umweltforschung, 39 (1978)

HELMBOLD, H., W. VOELTER and E. REINHARD: Sterols in Cell Cultures of Digitalis lanata. Planta Med. 33, 185 (1978)

HELMBOLD, U.: Versuche zur Steigerung der 12β-Hydroxylierung von β-Methyldigitoxin durch Fermenterkulturen von Digitalis lanata Zellstämmen. Dissertation Tübingen (1979)

KARTNIG, Th., KUMMER-FUSTINIONI, G. und HEYDEL, B.: Der

Einfluß des Alterns auf die Sekundärstoffbildung in Gewebekulturen aus Digitalis purpurea. Planta Med. 47, 247 (1983)

KARTNIG, Th. und W. SCHLAGINTWEIT: Zur Kenntnis der Peroxidase-Aktivität und der Peroxidase-Isoenzymmuster von Gewebekulturen aus Digitalis lanata und Digitalis purpurea. Planta Med. 47, 249 (1983)

LEISTNER, E.: Isolierung, Identifizierung und Biosynthese von Antrachinonen in Zellsuspensionskulturen von Morinda citrifolia. Planta Med. Suppl. 214 (1975)

REINHARD, E.: Biotransformation by plant tissue culture. in: Tissue Culture and Plant Science 1974, Street, H.E. (ed.), London-New York-San Francisco, Academic Press 443 (1974)

REINHARD, E., H.M. BOY und F. KAISER: Umwandlungen von Digitalis-Glykosiden durch Zellsuspensionskulturen Planta Med. Suppl. 163 (1975)

REINHARD, E., A.W. ALFERMANN: Biotransformation by Plant Cell Cultures. in: Adv. Biochem. Engin. 16, 49 (1980)

ROTHENBERGER, S.: Untersuchungen zur Bildung von Protoberberin-Alkaloiden in Zellkulturen von Berberis wilsoniae Hemsl. & Wils. Dissertation Tübingen (1982)

SZELECZKY, Z. and T. LÅNG: Purification and Separation of Digoxin by Removal of Accompanying Glycosides as Phenylboronate Derivatives. Planta Med. 40, 320 (1980)

TEUSCHER, E.: Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen. Pharmazie 28, 6 (1973)

WÄHL, J.: Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen und 12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin durch Zellkulturen von Digitalis lanata. Dissertation Tübingen (1977)

WEILER, E.: Stoffwechsel von Digitoxin in Digitalis lanata Ehrh. Hausarbeit der 1. Staatsprüfung für das Lehramt am Gymnasium, Ruhr-Universität Bochum (1974)

ZENK, M.H., H. EL-SHAGI and U. SCHULTE:Anthraquinone Production by Cell Suspension Cultures of Morinda citrifolia. Planta Med. Suppl. 79 (1975)

ZENK, M.H., H. EL-SHAGI, H. ARENS, J. STÖCKIGT, E.E. WEILER and B. DEUS: Formation of the Indole Alkaloid Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. in: W.Barz, E. Reinhard, M.H.Zenk (eds.), Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Berlin-Heidelberg-New York 1977, Springer Verlag, 27 (1977 a)

ZENK, M.H., H. EL-SHAGI and U. ULBRICH: Production of Rosmarin Acid by Cell Suspension Culture of Coleus blumei. Naturwissenschaften 64, 585 (1977 b)

ZENK, M.H.: The Impact of Plant Cell Culture on Industry in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, T.A. Thorpe (ed.), Calgary, Canada, University Press, 1 (1978 a)

ZIEG, R.G., S.W. ZITO, E.J. STABA: Selection of High Pyrethrin Producing Tissue Cultures. Planta Med. 48, 88 (1983)

Meine akademischen Lehrer waren - neben Prof. Dr.

E. Reinhard - die Herren Professoren :

E. Graf, W. Kraus, Y. S. Gao, S. H. Hong, G. J. Liu

S. X. Peng, Y. Y. Xie, G. J. Xu, S. D. Yi, R. H. Zhu

Lebenslauf

1934	Am 3. November in Anhui als Tochter und viertes Kind des Bankdirektors Guanzu Hu und Cuiying Cheng
1940-1946	Besuch der Grundschule in Nanking
1946-1949	Besuch der Mittelschule in Yangzhou
1949-1952	Besuch der Oberschule in Yangzhou
1952	Am 6. Juli das Abitur abgelegt
WS 1952- Juli 1956	Studium der Pharmazie an der Universität Nanking, Fakultät für Pharmazie, Staatsexamen am 18. Juli 1956
Sept. 1956- Sept. 1959	Doktorandin bei Herrn Prof. Dr. S. D. Yi am Lehrstuhl für Pharmakognosie der Fakultät für Pharmazie in Nanking
1959-1963	am Lehrstuhl für Pharmakognosie der Fakultät für Pharmazie in Nanking als wissenschaftliche Assistentin
1963-1980	wissenschaftliche Angestellte, seit August 1978 als Dozentin der Abteilung für Phytochemie des Instituts für Medikamente der chinesischen Akademie der Wissenschaften in Shanghai
1981-1984	mit der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Reinhard am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie in Tuebingen

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69